

Aus dem Bereich der Inneren Medizin III  
Klinische und Experimentelle Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg /Saar  
(Prof. Dr. med. Ulrich Laufs)

**Regulation der Telomeraseaktivität und telomer-assoziiierter  
Faktoren durch körperliche Aktivität in Mäusen und im Menschen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2014

Vorgelegt von:  
Maxi Hauser  
geboren am 26.12.1986  
in Bruchsal

Gewidmet meinen Eltern.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Zusammenfassung.....	9
1.1 Regulation der Telomeraseaktivität und telomer-assoziiierter Faktoren durch körperliche Aktivität in Mäusen und im Menschen.....	9
1.2 Regulation of telomerase activity and telomere-associated proteins by physical activity in mice and men .....	11
2 Einleitung .....	13
2.1 Gesellschaftliche Bedeutung des Alterns und Alter als kardiovaskulärer Risikofaktor.....	13
2.2 Alterung auf Ebene der Organe und Zellen: Telomere, Zellzyklus und seneszenz-regulierende Proteine.....	16
2.3 Der Zusammenhang zwischen kardiovaskulärer Schädigung und kardiovaskulärer Zellalterung .....	18
2.4 Der Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Organ- und Zellalterung.....	19
2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit .....	21
3 Material und Methoden.....	22
3.1 Material .....	22
3.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	22
3.1.2 Antikörper und Primer .....	23
3.1.2.1 Primärantikörper.....	23
3.1.2.2 Sekundärantikörper.....	24
3.1.2.3 Primer semiquantitative PCR.....	24
3.1.2.4 Primer Real-Time PCR .....	24
3.1.3 Puffer und Lösungen.....	24
3.1.3.1 Ansatz für allgemein verwendete Puffer und Stammlösungen .....	24
3.1.3.2 Ansatz für speziell verwendete Puffer und Lösungen .....	25

3.1.4	Molekularbiologische Kits.....	26
3.1.5	Geräte.....	27
3.1.5.1	Allgemein .....	27
3.1.5.2	Western Blot .....	27
3.1.5.3	DNA-Messung.....	28
3.1.5.4	TRAP-Assay .....	28
3.1.5.5	Reverse Transkription (RT) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
3.1.5.6	Real-Time PCR.....	28
3.1.6	Software.....	28
3.1.7	Versuchsgruppen.....	29
3.1.7.1	Mäuse .....	29
3.1.7.2	Akutversuch (Waldlauf).....	30
3.1.7.3	Intervalltrainingsstudie .....	31
3.2	Methoden .....	32
3.2.1	Zellisolation (MNCs).....	32
3.2.1.1	Blut-Ficoll .....	32
3.2.1.2	Milz-Ficoll .....	34
3.2.2	RNA-Isolation, Reverse Transkription der RNA und Polymerase-Kettenreaktion.....	34
3.2.2.1	RNA-Isolation.....	34
3.2.2.2	Reverse Transkription (RT).....	35
3.2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (semiquantitativ).....	35
3.2.3	Western Blot .....	36
3.2.3.1	Allgemeines zum Western Blot-Verfahren .....	36
3.2.3.2	Proteinisolation .....	37
3.2.3.3	Proteinbestimmung nach Lowry .....	37
3.2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38

3.2.3.5	Proteintransfer .....	38
3.2.3.6	Antikörperinkubation .....	39
3.2.3.7	Entwickeln.....	40
3.2.4	Telomerlängenmessung mittels Real-Time-PCR .....	40
3.2.4.1	Allgemeines .....	40
3.2.4.2	DNA-Isolation.....	41
3.2.4.2.1	DNA-Isolation aus mononukleären Zellen (MNC) .....	41
3.2.4.2.2	DNA-Isolation aus Gewebe .....	41
3.2.4.3	DNA-Bestimmung .....	42
3.2.4.4	Durchführung und Auswertung .....	42
3.2.5	Telomeraseaktivitätsmessung (TRAP-Assay).....	43
3.2.5.1	Allgemeines .....	43
3.2.5.2	Proteinisolation .....	43
3.2.5.2.1	MNC .....	43
3.2.5.2.2	Gewebe .....	43
3.2.5.3	Messung der Telomeraseaktivität .....	43
3.2.6	Statistische Analyse .....	44
4	Ergebnisse .....	45
4.1	Mäuse .....	45
4.1.1	Charakteristika der verwendeten Mausgruppen.....	45
4.1.2	Vergleich der Telomeraseaktivität zwischen verschiedenen Organen bei jungen und alten Mäusen unter dem Einfluss des Lauftrainings.....	45
4.1.3	Hochregulation Telomer-regulierender Faktoren .....	46
4.1.4	Regulation der Telomerlänge.....	46
4.1.5	Regulation der Seneszenzmarkerproteine und Zellzyklusregulatoren p16, p53, Chk2 und pAKT durch Alter und körperliche Aktivität.....	47
4.2	Akute Regulation der MNC-Telomeraseaktivität und telomer-assoziiierter Faktoren durch körperliche Aktivität .....	48
4.2.1	Charakteristika der „Waldläufer“ .....	48

4.2.2	Akute Regulation von Telomerase, Telomer-regulierender Faktoren und Zellzyklusregulatoren .....	49
4.3	Prospektive Pilotstudie zur Messung des Einflusses eines dreimonatigen Intervalltrainings auf Telomeraseaktivität und telomer-assoziierte Faktoren ...	49
4.3.1	Charakteristika der Trainingsstudienteilnehmer .....	49
4.3.2	Effekte von Intervalltraining auf Telomerase und Seneszenzmarker in zirkulierenden Zellen .....	50
5	Diskussion .....	52
5.1	Effekte eines dreiwöchigen Lauftradtrainings auf die Zellalterung in jungen und alten Mäusen .....	53
5.2	Effekte von körperlicher Aktivität auf Telomerase und telomer-assoziierte Faktoren im Menschen .....	57
5.3	Limitationen der Arbeit .....	60
5.4	Fazit und klinischer Ausblick .....	61
6	Literaturverzeichnis .....	63
7	Danksagung und Publikationen .....	69
8	Lebenslauf .....	71

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillatum
BMI	Body Mass Index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy DNA
Chk2	Cell Cycle Checkpoint-Kinase 2
d	Tag
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	Endothelial Progenitor Cells
g	Gramm
h	Stunde
HEK	Human Embryonic Kidney
HF	Herzfrequenz
HG	Herzgewicht
IGF	Insulin-like Growth Factor
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
km	Kilometer
l	Liter
m	Milli ( $10^{-3}$ ) / Meter
M	Molar
max.	maximal
min	Minute(n)
MNC	mononukleäre Zelle(n)
Mo	Monat

n	Anzahl / nano ( $10^{-9}$ )
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
POT1	Protection Of Telomeres 1
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute – Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
s	Sekunden
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SEM	Standardfehler
Tab.	Tabelle
TERC	Telomerase RNA Component
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TRF1	Telomere Repeat-Binding Factor 1
TRF2	Telomere Repeat-Binding Factor 2
U	Units – Einheit der Enzymaktivität
u.	und
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
u.v.a.	und viele andere
V	Volt / Laufgeschwindigkeit
Vgl.	Vergleich
VO2	Sauerstoffaufnahme
vs.	versus
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )



# **1 Zusammenfassung**

## **1.1 Regulation der Telomeraseaktivität und telomer-assoziiierter Faktoren durch körperliche Aktivität in Mäusen und im Menschen**

Fortschreitendes Alter und körperliche Inaktivität stehen in engem Zusammenhang mit der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen, welche unter anderem wahrscheinlich durch zelluläre Alterungsprozesse ausgelöst werden. Die Zellalterung wird durch die Aktivität der Telomerase und durch telomer-assoziierte Faktoren gesteuert. Regelmäßige körperliche Aktivität ist mit positiven kardiovaskulären Effekten assoziiert. Bis heute sind jedoch die molekularen Mechanismen nur teilweise verstanden.

Basierend auf den Vorarbeiten beschäftigt sich diese Promotionsarbeit mit der Erforschung der molekularen Wirkung von Sport auf Telomerase, telomer-assoziierte Faktoren u. Seneszenzmarker.

Im ersten Teil des Projekts wurden 4 Mausgruppen miteinander verglichen. Es handelte sich um junge und alte C57Bl/6-Mäuse, bei denen das Modell des freiwilligen Laufradtrainings eingesetzt wurde. Bei den jungen Mäusen führte ein dreiwöchiges Training zu einer Erhöhung der kardialen und aortalen, aber nicht der hepatischen Telomeraseaktivität. Ebenso war der Telomere Repeat-Binding Factor (TRF2), ein Protein zur Stabilisierung der Telomere, in Western-Blot-Analysen in Myokard und Aorta der laufenden Tiere gesteigert, nicht aber in der Leber. Parallel dazu kam es zu einer Abnahme der Seneszenzmarker p16, p53 und Chk2 im Myokard und in der Aorta. Bei den alten Mäusen waren die Telomeraseaktivität und TRF2-Expression im Vergleich zu den jungen Mäusen basal erhöht und das Lauftraining hatte keinen signifikanten zusätzlichen Effekt auf diese Parameter. Parallel war die Expression von Seneszenzmarkern erhöht und diese wurden durch das Training in den alten Mäusen signifikant vermindert.

Im zweiten Teil des Projekts wurde untersucht, ob körperliche Aktivität zu einem akuten Einfluss auf die Telomerase in zirkulierenden Zellen führt. Dies wurde an einer Gruppe von 10 jungen, gesunden Probanden ohne regelmäßiges Ausdauertraining getestet, die einen Waldlauf durchführten. Im Zeitverlauf von 24 Stunden nach dem Training kam es zu einer Heraufregulation der Telomeraseaktivität und der TRF2-Expression in den mononukleären Zellen.

Im dritten Projektteil absolvierten 10 unsportliche Personen über 3 Monate ein hochintensives, kontrolliertes Lauftraining. Hierbei kam es zu einer Heraufregulation der basalen Telomeraseaktivität und der TRF2-Expression sowie zu einer verminderten Expression der Seneszenzmarker p16 und p53 in zirkulierenden Blutzellen.

Mit Hilfe dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse hinsichtlich der molekularen Wirkung von Sport auf Regulatoren der zellulären Alterung gewonnen werden. Es wurde bestätigt, dass Lauftraining in kardiovaskulären Geweben von jungen Mäusen die Telomerbiologie günstig beeinflusst. Im Gegensatz dazu hatten alte Mäuse bereits basal eine erhöhte Telomeraseaktivität und TRF2-Expression parallel zu einer gesteigerten Seneszenzmarkerexpression. Dies weist auf einen altersabhängigen Anpassungsprozess im Herzen und der Aorta hin, der durch Lauftraining günstig beeinflusst wird. Im Menschen wurde erstmal eine akute Regulation telomer-assoziiierter Proteine belegt. In einer kontrollierten Trainingsstudie wurde prospektiv gezeigt, dass ein Intervalltraining kurzfristig zu einem Einfluss auf Telomerproteine und Seneszenzmarker führt.

Im Einklang mit den Vorarbeiten identifiziert diese Arbeit körperliche Aktivität als sehr wirkungsvolles Instrument, um in kardiovaskulären Zellen Alterungsmechanismen günstig zu beeinflussen. Dieser Effekt ist in jungen und in alten Mäusen zu beobachten, es gibt akute Regulationsmechanismen, und untrainierte Probanden scheinen von einem Ausdauertraining kurzfristig hinsichtlich der zellulären Alterung zu profitieren.

## **1.2 Regulation of telomerase activity and telomere-associated proteins by physical activity in mice and men**

Advancing age and physical inactivity are primordial risk factors for the pathogenesis of cardiovascular diseases, which – amongst other contributing risk factors – are probably accelerated by cellular aging processes. Senescence on the cellular level is governed by telomerase activity and telomere-associated proteins. Regular physical activity is associated with positive cardiovascular effects. However, the underlying molecular mechanisms are incompletely understood. Based on previous works, this doctoral thesis further explored the effects of physical activity on telomerase, telomere-associated factors and senescence markers in mice and men.

In the first part of the study four groups of mice were compared. Young and old C57Bl/6 mice were subjected to three weeks voluntary running wheel exercise. In the young mice this training led to an up-regulation of cardiac and aortic, but not hepatic, telomerase activity. In addition, telomere repeat-binding factor (TRF) 2, a telomere-stabilizing capping protein, was increased at the protein level in the myocardium and aorta of running animals, but not in the liver. In parallel, there was a decrease of senescence marker expression (p16, p53 and Chk2) in myocardium and aorta. In old mice telomerase activity and TRF2 expression were basally increased compared to young mice and running wheel exercise for 3 weeks had no significant additional effect on these parameters. In contrast, expression of senescence markers was increased at basal levels compared to young mice and was significantly decreased by training in old mice.

In the second part of the study the acute effects of a single exercise bout on telomerase activity of circulating cells were determined. This hypothesis was tested in a group of 10 young healthy volunteers performing a 45-minute run at moderate speed. A time-response curve after the bout demonstrated a bell-shaped up-regulation of telomerase activity and TRF2 expression in mononuclear cells which began immediately after exercising and lasted for at least 24 hours.

In the third part of the project, 10 untrained middle-aged volunteers took part in a high intensity interval exercise training programme for 3 months (3 x per week). The analyses showed an up-regulation of basal telomerase activity and TRF2 expression

paralleled by a reduced expression of senescence markers p16 and p53 in circulating blood cells after the training period.

This work revealed new insights in the effects of physical exercise on regulators of cellular aging. Voluntary running wheel exercise positively affects telomere-associated proteins in cardiovascular tissues of young mice. In contrast, old mice were characterized by increased telomerase activity and TRF2 expression at baseline paralleled by an increased expression of senescence markers. This implicates an age-related adaptation process in the heart and aorta, which is positively influenced by physical activity. This study is the first to show an acute regulation of telomere-associated proteins in humans after a single exercise bout. The findings were corroborated in a prospective training study showing that interval training impacts on telomere-regulating proteins and senescence markers in circulating blood cells.

In accordance with our previous studies this work confirmed that physical activity is an effective intervention to positively influence cellular senescence in cardiovascular cells. This effect can be observed both in young and old mice, a single exercise bout results in an acute up-regulation of telomerase activity in circulating cells, and a controlled high intensity exercise training affects cellular senescence regulators.

## 2 Einleitung

### 2.1 Gesellschaftliche Bedeutung des Alterns und Alter als kardiovaskulärer Risikofaktor

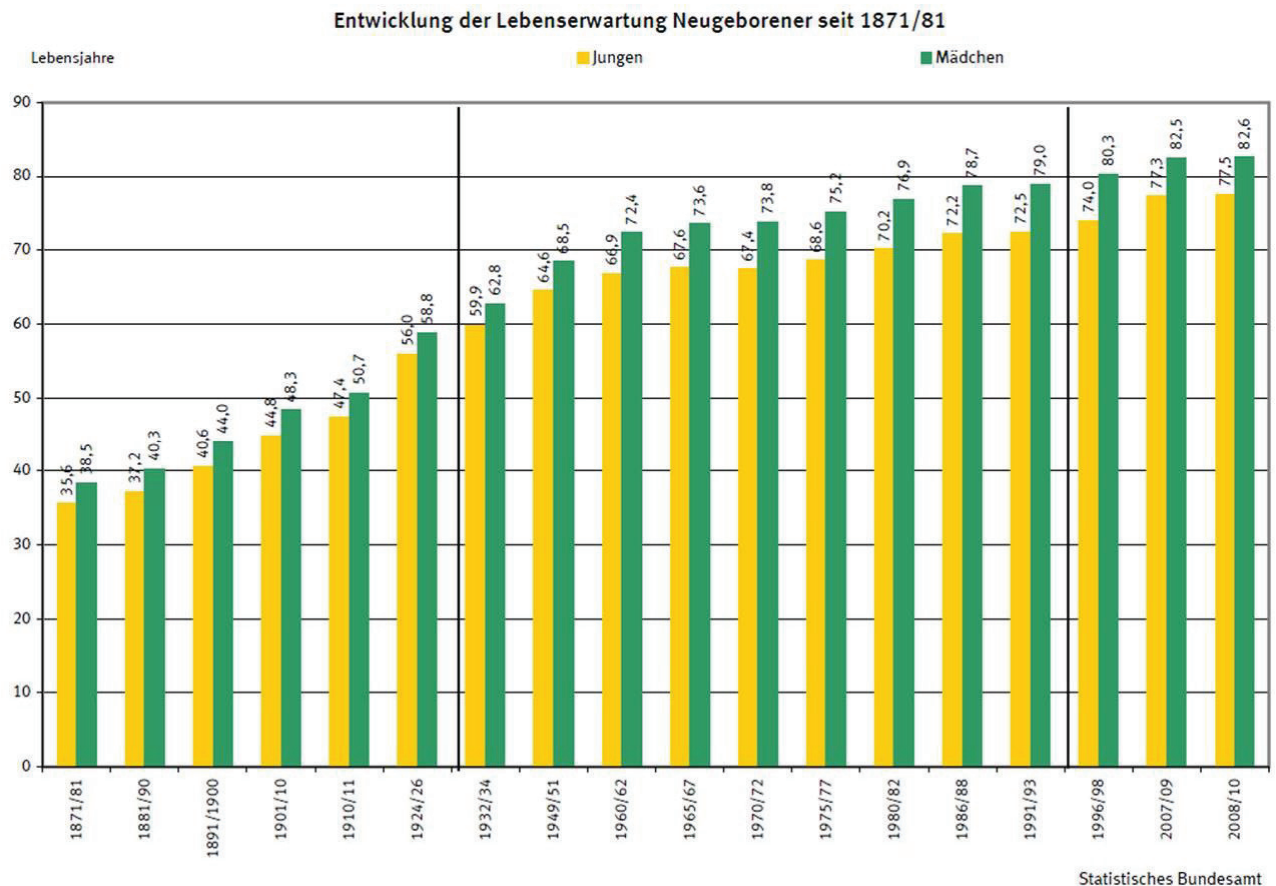
*„Altern ist eins der am wenigsten verstandenen Phänomene der menschlichen Biologie. Nach einer allgemein akzeptierten Theorie entsteht Altern aus einer Summe verschiedener Mechanismen, die die Lebensdauer von biologischen Systemen (Zellen, Organen und Organismen) begrenzen. Um welche Abläufe es sich handelt oder wie sie beeinflusst werden könnten, ist zur Zeit allerdings kaum bekannt. In unserer Gesellschaft tritt aber bei steigender Lebenserwartung der natürliche Alterungsprozess immer deutlicher zutage und gewinnt als Erkrankungs- und Todesursache an Bedeutung. Die Beherrschung vieler der medizinischen Probleme des hohen Alters bleibt jedoch bislang offen.“ (Krutmann, 2008).*

Bei steigendem Wohlstand, immer besser werdenden Behandlungsmethoden durch die Fortschritte in Medizin und Pharmakologie sowie einem wachsenden gesundheitsbewussten Verhalten, verzeichnet Deutschland einen stetigen Anstieg der alten Bevölkerung. Im Verlauf der Jahre hat sich die Altersstruktur ausgehend von der klassischen Pyramidenform in eine Glockenform verwandelt (Statistisches Bundesamt Deutschland). **Abbildung 1** zeigt die Altersentwicklung in Deutschland im Verlauf von 100 Jahren.



**Abbildung 1:** Altersentwicklung in Deutschland (Quelle: Statistisches Bundesamt Deutschland)

Bei sinkenden Geburtenraten und steigender Lebenserwartung, lebten in Deutschland 2009 ca. 82 Millionen Menschen, von denen 17 Millionen 65 Jahre oder älter waren (Statistisches Bundesamt Deutschland). Die durchschnittliche Lebenserwartung Neugeborener liegt heute bei ca. 82,6 Jahren bei den Frauen und 77,5 Jahren bei den Männern (Statistisches Bundesamt Deutschland) (**Abb. 2**). Die durchschnittliche Lebenserwartung 60-Jähriger liegt heute bei ca. 84,9 Jahren bei den Frauen und 81,2 Jahren bei den Männern (Statistisches Bundesamt Deutschland).



**Abbildung 2:** Entwicklung Lebenserwartung Neugeborener in Deutschland (Quelle: Statistisches Bundesamt Deutschland)

Das Alter ist einer der bedeutendsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (Framingham Risk Calculator, National Heart, Lung and Blood Institute). Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören zu den Erkrankungen des höheren Alters. So ist das Alter neben Rauchen, arterieller Hypertonie, LDL-Cholesterin-Erhöhung und HDL-Cholesterin-Erniedrigung und Diabetes mellitus ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit (Wilson et al., 1998). Die KHK ist eine der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität (Yusuf et al., 2004). Durch Prävention der verschiedenen Ursachen bzw. Behandlung der Risikofaktoren kann das Risiko für die KHK gesenkt werden.

## 2.2 Alterung auf Ebene der Organe und Zellen: Telomere, Zellzyklus und seneszenz-regulierende Proteine

Als Telomere bezeichnet man die endständigen Anteile der Chromosomen, die deren Stabilität bewahren und diese vor dem Abbau schützen. Telomere sind Ribonukleinkomplexe, bestehend aus doppelsträngiger DNA mit Wiederholungen der Basenabfolge TTAGGG und einem überlappenden DNA-Einzelstrang, dem sogenannten "g-strand", mit einem 3' OH-Ende. Zusammen mit anderen Faktoren, z.B. dem Telomere Repeat-Binding Factor TRF2, bilden sie schleifenähnliche Strukturen, die sogenannten T-Loops (**Abb. 3**). Je älter man wird, desto kürzer werden die Telomere, da mit jeder Zellteilung TTAGGG-Wiederholungen verloren gehen.

Hauptverantwortlich hierfür ist ein bestimmtes Enzym, die Telomerase, welches an das 3' OH-Ende der Telomere ansetzt und zu einer Verlängerung derselben führt. Je höher die Aktivität dieses Enzyms ist, desto stabiler und somit länger bleiben die Telomere und das Genom ist geschützt (Blasco, 2005).

Die Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex mit der Funktion einer DNA-Polymerase. Sie besteht aus einer katalytischen Untereinheit TERT, einer RNA Komponente TERC, welche als Matrize für die Bildung neuer Telomere dient, und dem Protein Dyskerin, welches für die Bindung und Stabilität der TERC verantwortlich ist (Donate & Blasco, 2011).

Der Telomere Repeat-Binding Factor TRF2 verhindert eine End-zu-End-Fusion zwischen den Telomeren und spielt so als „Capping“-Protein eine entscheidende Rolle beim Schutz der Telomere (van Steensel et al., 1998). TRF2 stabilisiert die "telomerische T-Loop" (Baker et al., 2011). Zusammen mit TRF1, POT1 und weiteren Proteinen bildet TRF2 einen Komplex, das Telosom (de Lange, 2009). TRF2 schützt so vor einer Dysfunktion der Telomere und ist u.a. damit ein entscheidender Faktor für das Überleben von kardiovaskulären Zellen, was potentiell bedeutsam für die Entstehung altersabhängiger Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist (Serrano & Andrés, 2004).

Neben der Aktivität der Telomerase und TRF2 spielen weitere Faktoren wie z.B. oxidativer Stress und die seneszenz-regulierenden Proteine p16, p53, Chk2 und pAKT im Prozess der Zellalterung eine wichtige Rolle.

Das Tumorsuppressorprotein p16, auch bekannt als cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A), major tumor-suppressor 1 (MTS-1) oder inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a (INK4a), blockiert den Zellzyklus und fördert die zelluläre Alterung. Die

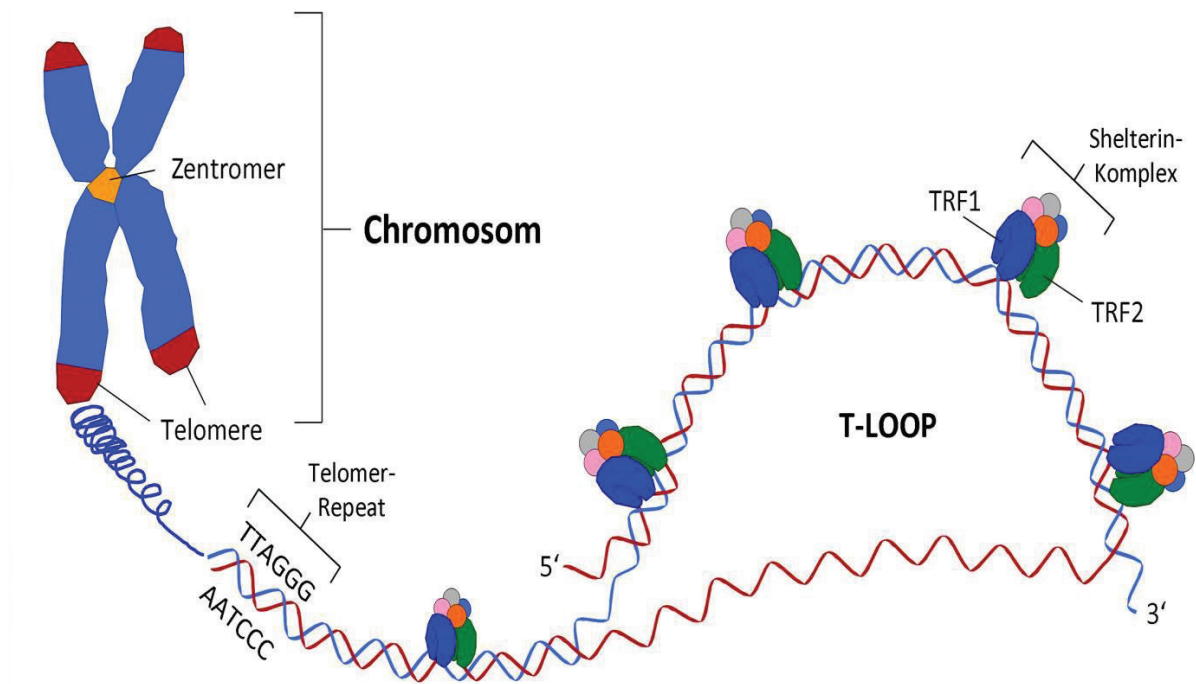


Hauptaufgabe von p16 ist es, den Zellzyklus am G1/S-Übergang anzuhalten. Der Verlust der p16-Funktion führt zu unkontrolliertem Zellwachstum und somit z.B. zur Wucherung von Krebszellen. So wurde in vielen Krebsarten wie Melanomen, Ösophaguskarzinomen, Pankreaskarzinomen, Mammakarzinomen u.v.a. inaktiviertes p16 nachgewiesen (Liggett & Sidransky, 1998).

Das Tumorsuppressorprotein p53, auch als "Wächter des Genoms" bezeichnet, blockiert den Zellzyklus und führt – wenn es aktiviert wird – zum Zelltod. Die Aktivität von p53 ist auch bei der zellulären Alterung erhöht (Rodier et al., 2007). In vielen Krebszellen findet man mutiertes, inaktives p53 (Oren & Rotter, 2010). D.h. p53 hat einerseits die Aufgabe der Kontrolle des Zellzyklus und andererseits verhindert es die Entstehung von Krebs (Hur & Walker, 2009).

Auch die Checkpoint Kinase 2 (Chk2) ist ein Tumorsuppressorprotein und arbeitet Hand in Hand mit p53, indem sie die Funktion von p53 reguliert. Sie sorgt dafür, dass sich die Zelle im Falle eines DNA-Schadens, verursacht z. B. durch ionisierende Strahlung, nicht unkontrolliert vermehrt (Gire et al., 2004). Mutiertes Chk2 findet sich ebenfalls in vielen Tumoren (Bell et al., 1999). Auch bei der Herzinsuffizienz spielt Chk2 eine Rolle. So fand man bei einer Herzinsuffizienz in Herzmuskelzellen eine Heraufregulation von Chk2 parallel zu einer supprimierten TRF2-Funktion, was wahrscheinlich über eine schnellere Verkürzung der Telomere zur Kardiomyozytenapoptose führt (Oh et al., 2003).

Die Proteinkinase AKT ist bedeutsam für Signalwege, die Überleben und Proliferation von Zellen steuern, sie wird daher auch als „Survivalkinase“ bezeichnet und hat eine anti-apoptotische Funktion. Sie spielt eine kardioprotektive Rolle, und Änderungen ihrer Aktivität werden mit der Entstehung von Herzkreislauferkrankungen in Verbindung gebracht. Bei genetischem Verlust der AKT-Aktivität im Herzen entsteht ein myokardiales "Remodeling" mit der Folge einer Herzinsuffizienz (Sussman et al., 2011).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung von Chromosom, Telomer und T-Loop (nach Calado & Young, 2009)

### 2.3 Der Zusammenhang zwischen kardiovaskulärer Schädigung und kardiovaskulärer Zellalterung

Ein kausaler Zusammenhang zwischen der kardiovaskulären Zellalterung und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen wird bereits seit den 1970er Jahren vermutet (Martin & Sprague, 1972), ist aber bis heute nicht im Detail verstanden. In Patienten mit Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinkonsum, Atherosklerose oder chronischer Herzinsuffizienz lässt sich eine reduzierte Leukozytentelomerlänge nachweisen (Fuster & Andrés, 2006; van der Harst et al., 2007; Samani et al., 2001). In Analysen von atherosklerotischen Plaques wurde gezeigt, dass sich dort vermehrt seneszente Zellen nachweisen lassen und es zudem, im Vergleich zu normalen Gefäßen, zu einer Verkürzung der Telomere kommt (Matthews et al., 2006). Was jedoch die Ursache für diese Veränderungen ist, bleibt bislang unbekannt. Postuliert wird, dass sich die Telomere vor allem in Zonen mit hohem Scherstress verkürzen. Eine weitere Studie zeigte, dass die Telomerlänge von Leukozyten mit der Telomerlänge in der Aorta korreliert und somit die Leukozytentelomerlänge als Surrogatparameter für die Gefäßalterung verwendet werden kann (Wilson et al., 2008). Einzelne Studien zeigten, dass die Geschwindigkeit der Leukozytentelomererosion durch therapeutische

Maßnahmen beeinflusst werden kann (z.B. Lebensstiländerung, Statintherapie) (Ornish et al., 2008; Brouillette et al., 2007). Bis heute ist jedoch unklar, ob Menschen mit einer kürzeren Telomerlänge ein höheres Risiko haben, eine Atherosklerose zu entwickeln. Deshalb ist es notwendig, den Zusammenhang von Telomeren und kardiovaskulären Erkrankungen über die Leukozytentelomerlänge hinaus weiter zu erforschen. Es ist auch klar, dass eine kardiovaskuläre Pathologie nicht unbedingt gleichbedeutend mit einer Reduktion der Leukozytentelomerlänge ist, was kürzlich publizierte Studien zeigten. Z.B. fanden Vasan et al. heraus, dass bei Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie, insbesondere bei Hypertonikern, die Leukozytentelomerlänge höher ist, als bei Kontrollen ohne linksventrikuläre Hypertrophie (Vasan et al., 2009). Somit könnte die Telomerbiologie nicht nur ein Biomarker für die Akkumulation oxidativer Schäden sein, sondern einen Hinweis auf einen aktiven Regulationsprozess geben.

## **2.4 Der Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Organ- und Zellalterung**

Körperliche Aktivität wirkt sich positiv auf die Gesundheit und auf den Alterungsprozess aus. Neben einer Risikoreduktion für Demenzerkrankungen (Scarmeas et al., 2009), Diabetes Mellitus Typ II (Ekelund et al., 2012) und einer abdominalen Fettreduktion (Irving et al., 2008), spielt körperliche Aktivität vor allem eine wichtige Rolle bei der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen (Perk et al., 2012). Die kardiovaskulären Erkrankungen stehen bei den Todesursachen in Deutschland an erster Stelle (Statistisches Bundesamt Deutschland). Deshalb ist die Empfehlung regelmäßiger, körperlicher Aktivität Bestandteil der Leitlinien zur Primär- und Sekundärprävention von Herz-Kreislauferkrankungen (Perk et al., 2012). Körperliche Aktivität führt in Patienten mit KHK zu einer Verbesserung der koronaren Endothelfunktion, der Trainingskapazität und einer verbesserten Kollateralisation (Gielen et al., 2010). In welchem Zusammenhang jedoch die körperliche Aktivität mit dem Altern auf molekularer Ebene steht, ist bis heute nur teilweise verstanden. Zudem ist es unklar, was eine optimale Form bzw. eine notwendige „Dosierung“ der körperlichen Aktivität darstellt.

Basierend auf den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe „Effects of Physical Exercise on Myocardial Telomere-Regulating Proteins, Survival Pathways, and Apoptosis“ (Werner et al., 2008) und „Physical Exercise Prevents Cellular Senescence in Circulating

Leukocytes and in the Vessel Wall“ (Werner et al., 2009) beschäftigt sich diese Promotionsarbeit mit der Gewinnung weiterer Erkenntnisse hinsichtlich der molekularen Wirkung von Lauftraining auf die Organ- und Zellalterung in Mäusen und im Menschen.

In den oben genannten Arbeiten wurde die Regulation telomer-assoziiierter Faktoren in C57Bl/6 Wildtyp-Mäusen und Knockout-Mäusen ohne eine funktionsfähige endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) bzw. Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) mit und ohne freiwilliges Lauftraining untersucht. Die Telomeraseaktivität wurde in den Wildtyp-Mäusen durch ein dreiwöchiges, freiwilliges Laufradtraining in Herz, Aorta und mononukleären Zellen (MNC) im Vergleich zu den Mäusen ohne Laufrad hochreguliert. Zudem kam es zu einer Heraufregulation von TRF2 und des DNA-Reparaturfaktors Ku70 und im Gegensatz dazu zu einer Herabregulation der Zellzyklusinhibitoren und Seneszenzmarker p16, p53 und Chk2 bei den Tieren mit Laufradtraining. Diese Effekte blieben über einen Zeitraum von 6 Monaten erhalten. Die Telomerlänge änderte sich sowohl nach 3 Wochen als auch nach 6 Monaten durch Laufradtraining nicht signifikant, so dass die beobachtete Regulation telomerlängenunabhängig war. Die Effekte waren in den TERT-Knockout-Mäusen nicht zu beobachten. Um die Befunde auf ein Krankheitsmodell zu übertragen, wurden Mäusen mit und ohne dreiwöchiges Laufradtraining mit Doxorubizin, einem Anthrazyklin, behandelt, welches eine akute Kardiomyopathie durch Apoptose von Kardiomyozyten bewirkt. Bei den Mäusen mit Laufradtraining war die Apoptoserate der Herzmuskelzellen deutlich reduziert, was auf die erhöhte Telomeraseaktivität zurückzuführen ist.

In der darauffolgenden Studie wurden die tierexperimentellen Befunde auf den Menschen übertragen. Hierbei handelte es sich um 104 Personen, bestehend aus jungen Mittel- und Langstreckenläufern des Deutschen Leichtathletikverbands (Durchschnittsalter 20 Jahre, durchschnittliches Trainingsvolumen 73 km/Woche), Ausdauersportlern mittleren Alters des Masterathletenverbandes (Durchschnittsalter 51 Jahre, durchschnittliche Trainingsdistanz 80 km/Woche, Ausdauertraining im Mittel seit 35 Jahren) und als Kontrollen zwei Gruppen nicht sportlicher, gesunder Probanden, welche jeweils von Alter und Geschlecht den oben genannten Gruppen entsprachen. Die Analysen zeigten, dass sowohl bei den jungen als auch bei den Ausdauersportlern mittleren Alters die Telomeraseaktivität und die TRF2-Expression heraufreguliert und die Seneszenzmarker p16, p53 und Chk2 im Vergleich zu den Kontrollen herabreguliert waren. Als Hauptbefund zeigte sich, dass die bei den älteren Kontrollprobanden

nachweisbare Abnahme der Leukozytentelomerlänge in den Masterathleten deutlich reduziert war, d.h. dass langjähriges Ausdauertraining mit einer verminderten Telomererosion assoziiert war.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden im Anschluss an diese Erkenntnisse die Auswirkungen von körperlicher Aktivität auf Telomeraseaktivität, telomer-assoziierte Faktoren und Seneszenzmarker in Mäusen und im Menschen weiter untersucht.

## **2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden, basierend auf den genannten Vorarbeiten, die folgenden wissenschaftlichen Fragestellungen bearbeitet:

1. Einfluss von körperlicher Aktivität auf Telomerase und Regulatoren der zellulären Alterung in verschiedenen Organen und in zirkulierenden Zellen in jungen vs. alten Mäusen.
2. Akute Auswirkungen von sportlicher Aktivität auf Telomerase, TRF2- und Seneszenzmarkerexpression in jungen gesunden Menschen, die einen Waldlauf durchführen.
3. Prospektive Studie in untrainierten Probanden mittleren Alters, um den Einfluss eines dreimonatigen Intervalltrainings auf Telomerase, TRF2 und Seneszenzmarker zu überprüfen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

<b>Acrylamid 30%</b>	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
<b>Ammoniumpersulfat (APS 10%)</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>Aprotinin</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>Aqua ad iniectabilia</b>	(Braun, Melsungen)
<b>Aqua dest.</b>	(Braun, Melsungen)
<b>Biocoll Separating Solution</b>	(Biochrome AG, Berlin)
<b>Bromphenolblau</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>Diethylpyrocarbonat (DEPC)</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>di-Natriumhydrogenphosphat</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Dithiotreitol (DTT)</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)</b>	(VWR International, Darmstadt)
<b>ECL Entwicklerlösung</b>	(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
<b>Eisessig</b>	Merck, Darmstadt)
<b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>Ethanol absolut</b>	(VWR International, Darmstadt)
<b>Ethidiumbromid</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Fötales Kälberserum (FKS)</b>	(Gibco, Invitrogen, Karlsruhe)
<b>Glycerol</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>Glycin</b>	(VWR International, Darmstadt)
<b>HEK-Zellen</b>	(Gibco, Invitrogen, Karlsruhe)
<b>Isotone Kochsalzlösung 0,9%</b>	(Braun, Melsungen)
<b>Kaliumchlorid</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Kb Plus DNA Ladder</b>	(Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien)
<b>Ketaminhydrochlorid</b>	(Pfizer, Berlin)
<b>Leupeptin</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>Low Range Marker</b>	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)

<b>Methanol</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Natriumchlorid</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>peqGOLD RNAPure</b>	(Peqlab, Erlangen)
<b>Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>Protein-Assay Reagent A</b>	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
<b>Protein-Assay Reagent B</b>	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
<b>RNasin (RNase Inhibitor)</b>	(Promega, Madison, USA)
<b>SeaKem LE Agarose</b>	(Lonza, Basel, Schweiz)
<b>TEMED</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>TRAPeze 1x CHAPS Lysis Buffer</b>	(Millipore, Temecula, Californien)
<b>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</b>	(VWR, Belgien)
<b>Trockenmilchpulver</b>	(TSI GmbH, Zervén)
<b>Trypan Blue Solution 0,4%</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>Tween20</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
<b>Xylazinhydrochlorid (Rompun)</b>	(Bayer, Leverkusen)
<b>Xylen Cyanol F</b>	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

### 3.1.2 Antikörper und Primer

#### 3.1.2.1 Primärantikörper

<b>GAPDH, Mouse IgG</b>	6C5 Santa Cruz Biotechnology, sc-32233, Verdünnung 1:2000
<b>p16, Mouse IgG</b>	F-12 Santa Cruz Biotechnology, sc-1661, Verdünnung 1:500
<b>p53, Mouse IgG</b>	D-11 Santa Cruz Biotechnology, sc-17846, Verdünnung 1:500
<b>TRF2, Mouse IgG</b>	9F10 Santa Cruz Biotechnology, sc-47693, Verdünnung 1:400
<b>TRF2, Rabbit IgG</b>	H-300 Santa Cruz Biotechnology, sc-9143, Verdünnung 1:200
<b>CHK2, Mouse IgG</b>	A-11 Santa Cruz Biotechnology, sc-17747, Verdünnung 1:500
<b>p-AKT, Rabbit IgG</b>	(Ser473)-R Santa Cruz Biotechnology, sc-7985-R

Verdünnung 1:500

### 3.1.2.2 Sekundärantikörper

**Anti-Mouse IgG-Peroxidase** (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

**Anti-Rabbit IgG-Peroxidase** (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

### 3.1.2.3 Primer semiquantitative PCR

**GAPDH-forward** 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' 60 °C, 30 Zyklen

**GAPDH-reverse** 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

### 3.1.2.4 Primer Real-Time PCR

**36b4-fw** CACACTCCATCATCAATGGGTACAA

**36b4-rev** CAGCAAGTGGGAAGGTGTACTCA

**Tel02-fw** CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT

**Tel02-rev** GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT

**ACX** GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC (TRAP-Assay)

**TS** AATCCGTCGAGCAGAGTT (TRAP-Assay)

**18s-fw** 5'-TCA ACA CGG GAA ACC TCA C-3'

**18s-rev** 5'-ACC AGA CAA ATC GCT CCA C-3'

**p16-fw** 5'-GGA AGG TCC CTC AGA CAT C-3'

**p16-rev**      5'-GCA GTT GTG GCC CTG TA-3'

**GLB1-fw** 5'-TTT GAC TAC CTG CGC TTC CT-3'

**GLB1-rev** 5'-CTG TGA TGT TGC TGC CTG TT-3'

**TRF2-fw** 5'-TGT CTG TCG CGG ATT GAA GA-3'

**TRF2-rev** 5'-GCT GGA AGG TCT CAT ATG AA-3'

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

### 3.1.3.1 Ansatz für allgemein verwendete Puffer und Stammlösungen

**10x PBS**                      80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
pH auf 7,4 einstellen,  
ad 1 l mit A. dest.



**10x PBS Tween 1%**      80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 ml Tween20,  
pH auf 7,4 einstellen,  
ad 1 l mit Aqua dest.

**50xTAE**      484 g NaCl (4,14 M/l)  
37,2 g EDTA (64 mM/l)  
116 ml Eisessig (10 mM/l)  
pH auf 8,4 einstellen  
ad 2 l mit Aqua dest.

### 3.1.3.2 Ansatz für speziell verwendete Puffer und Lösungen

#### Milz-Ficoll

**Milzpuffer**      Ansatz für 500 ml:  
50 ml 10 x PBS steril  
5 ml FKS  
20 µl EDTA  
mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und unter Sterilbank  
steril filtrieren

#### DNA

**DNA-Gel**      1,2 g Universalagarose  
100 ml 1 x TAE-Puffer  
4 µl Ethidiumbromid

**DNA-Ladepuffer**      3 ml Glycerol  
7 ml Aqua dest.  
5,5 g Xylen Cyanol F

#### Proteinisolation

**Proteinlysepuffer**      5 ml Tris, 20 ml SDS 10%, 10 ml Glycerol, 15 ml A. dest.;  
Zur Proteinisolation pro 1 ml Lysepuffer:  
1 µl PMSF  
1 µl Leupeptin

0,8 µl Aprotinin

### Western Blot

<b>Trenngel (für 2 Gele)</b>	7,9 ml A. dest., 6,7 ml Acrylamid 30%, 5 ml Tris (pH 8,8), 0,2 ml SDS 10%, 0,2 ml APS 10%, 0,008 ml Temed
<b>Sammelgel (für 2 Gele)</b>	3,4 ml A. dest., 0,83 ml Acrylamid 30%, 0,63 ml Tris (pH 8,8), 0,05 ml SDS 10%, 0,05 ml APS 10%, 0,005 ml Temed
<b>Stacking Gel Buffer</b>	6,06 g Tris, 4 ml SDS 10%, pH auf 6,8 einstellen, ad 100 ml mit A. dest.
<b>Ladepuffer</b>	2 ml Glycerol, 2 ml SDS 10%, 2,5 ml Stacking Gel Buffer, 3 ml A. dest. Bromphenolblau zum Anfärben Vor Gelbeladung 50 µl DTT + 950 µl Ladepuffer
<b>10x Elektrophoresepuffer</b>	151,5 g Tris, 720 g Glycin, 50 g SDS, ad 5 l mit A. dest.
<b>Transferpuffer</b>	2,9 g Tris, 14,5 g Glycin, 200 ml Methanol, ad 1 l mit A. dest.

### **3.1.4 Molekularbiologische Kits**

<b>High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit</b>	(Applied Biosystems, USA)
<b>LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I</b>	(Roche, Mannheim)
<b>QIAamp DNA Mini Kit (50)</b>	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
<b>Taq-DNA-Polymerase Kit</b>	(Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

### 3.1.5 Geräte

#### 3.1.5.1 Allgemein

<b>Autoklav</b>	(Tuttnauer Systec 3050 EL)
<b>Citrat S-Monovette 10 ml 9NC</b>	(Sarstedt, Nümbrecht)
<b>Reaktionsgefäße</b>	(Sarstedt, Nümbrecht, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)
<b>Heizblöcke</b>	Thermomixer Comfort, Eppendorf Heap Labor Consult, Bovenden, Deutschland
<b>Kühlzentrifuge</b>	(Centrifuge Napco 2019R)
<b>Lichtmikroskop</b>	(Olympus CK2)
<b>Magnetrührer</b>	(Combimac RCH, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik)
<b>pH-Meter 526</b>	(WTW, Weilheim)
<b>Photometer</b>	(DU 730 Life Science UV/Vis, Beckman Coulter)
<b>Pipettierhilfe</b>	(Integra Pipetboy)
<b>Pipetten</b>	(Eppendorf Research Plus: 10 µl, 100 µl, 1000 µl)
<b>Pipettenspitzen:</b>	(Sarstedt, Nümbrecht)
<b>Potterstab</b>	(Braun, Melsungen)
<b>Tischzentrifugen</b>	(Eppendorf Centrifuge 5415 C, Heraeus Biofuge pico)
<b>Vortexer</b>	(Vortex-Genie 2, Scientific Industries)
<b>Waagen</b>	(Acculab UK, Edgewood, NY) <ul style="list-style-type: none"><li>➤ <b>VIC-Series 0,01 g Precision Balances</b></li><li>➤ <b>ALC-Series 0,0001 g Analytical Balances</b></li></ul>
<b>Zellkulturzentrifuge</b>	(Megafuge 1.0R, Heraeus)

#### 3.1.5.2 Western Blot

<b>Entwicklerautomat</b>	(Curix 60, Agfa, Mortsel, Belgien)
<b>Extra Thick Blot Paper</b>	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
<b>Filmkammer</b>	(Roth, Karlsruhe)
<b>Glasplattenspanner und -kammer</b>	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)

<b>Mini PROTEAN System</b>	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
<b>Glassplatten</b>	
➤ <b>Spacer Plates</b>	
➤ <b>Short Plates</b>	
<b>Mini PROTEAN Tetra System,</b>	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
<b>Elektrophoresekammer</b>	
<b>Nitrocellulose-Membran, 0,2 µm</b>	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
<b>PowerPac Basic</b>	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
<b>(300 V, 400 mA, 75 W)</b>	
<b>Schüttler Polymax 1040</b>	(Heidolph Instruments, Schwabach)
<b>Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer</b>	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
<b>Cell</b>	
<b>Überkopfschüttler REAX 2</b>	(Heidolph Instruments, Schwabach)
<b>Glaspipette</b>	(Hamilton Company, Nevada, USA)

### **3.1.5.3 DNA-Messung**

<b>NanoDrop 2000 Spectrophotometer</b>	(Thermo Scientific, Waltham, MA- USA)
--	---------------------------------------

### **3.1.5.4 TRAP-Assay**

<b>LightCycler Capillaries (20 µl)</b>	(Roche, Mannheim)
<b>LightCycler-System</b>	(Roche, Mannheim)

### **3.1.5.5 Reverse Transkription (RT) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

<b>Thermocycler</b>	(Thermo Electron Corporation, Waltham, MA- USA)
---------------------	---

### **3.1.5.6 Real-Time PCR**

<b>Step One Plus Real-Time PCR System</b>	(Applied Biosystems, Deutschland)
---	-----------------------------------

### **3.1.6 Software**

<b>Labworks V4.6</b>	(UVP, Upland, CA, USA)
<b>LightCycler Software V3.0</b>	(Roche, Mannheim)

**StepOne Software V2.0**

(Applied Biosystems, Deutschland)

**XnView**

(Pierre-Emmanuel Gougelet, Reims)

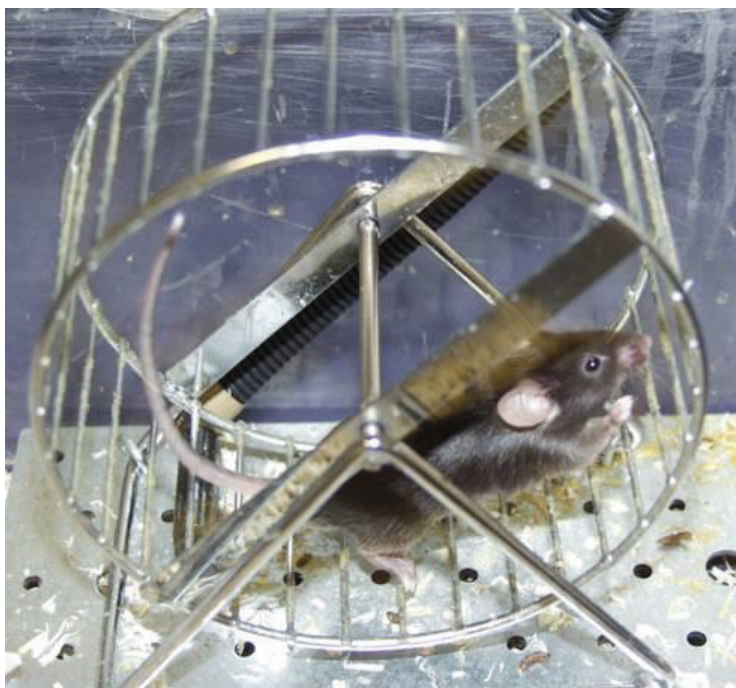
**GraphPad Prism V5.0**

(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)

### 3.1.7 Versuchsgruppen

#### 3.1.7.1 Mäuse

Bei den Mäusen handelte es sich um 4 Gruppen von C57Bl/6-Wildtypmäusen (**Tabelle 1**). Verglichen wurden junge und alte Mäuse mit und ohne ein freiwilliges Laufradtraining für 3 Wochen. Die Trainingsgruppen erhielten Laufräder für Nager (Durchmesser 12 cm), ausgestattet mit Kilometerzählern, in die Käfige (**Abb. 4**). Die Mäusegruppen wurden über einen Zeitraum von 3 Wochen in Quarantäne offen gehalten und die Laufräder zweimal pro Woche abgelesen. Am Ende des Experimentes wurden die Mäuse mit einem unverdünnten Gemisch aus Ketavet (100 mg/µl Ketaminhydrochlorid) und Rompun (2%, 23,32 mg Xylazinhydrochlorid) getötet, indem pro Maus 300 µl/20g intraperitoneal injiziert wurden. Anschließend wurden die Organe entnommen.



**Abbildung 4:** Maus beim freiwilligen Laufradtraining

### 3.1.7.2 Akutversuch (Waldlauf)

Bei den Waldläufern handelte es sich um junge Medizinstudenten und Mitarbeiter der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar. Die demographischen Daten und klinischen Parameter sind in **Tabelle 2** aufgelistet. Das wesentliche Einschlusskriterium war, dass die Probanden gesund waren und nur Freizeitsport betrieben. Nach Aufklärung und Einverständniserklärung erfolgte ein ergometrischer Einschlusstest. Zur Überprüfung der körperlichen Leistungsfähigkeit wurde ein Ruhe-EKG geschrieben, das bei allen Probanden unauffällig war. Zusätzlich durchliefen alle Studienteilnehmer eine Fahrradergometrie (Lode Excalibur, Firma Lode, Niederlande) am Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes (**Abb. 5**). Die Probanden begannen bei 100 Watt Leistung, die alle 3 Minuten um 50 Watt gesteigert wurde. Nach jeder dritten Minute wurde die Herzfrequenz gemessen. Hieraus ergab sich eine durchschnittliche maximale Leistung von  $3,8 \pm 0,2$  Watt/kg. Bei der Ergometrie zeigte keiner der Studienteilnehmer Anzeichen einer kardiovaskulären Erkrankung.

Für die Studie wurde eine akute körperliche Belastung, bestehend aus einem 5,6 km langen Waldlauf, durchgeführt, die in einer Zeit von 45 Minuten absolviert wurde (Durchschnittliche Geschwindigkeit 7,4 km/h). Den Studienteilnehmern wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten jeweils 40 ml Citratblut aus einer Ellenbeugenvene entnommen:

Zeitpunkt 0:	8:30 Uhr	vor dem Lauf
Zeitpunkt 1:	9:30 Uhr	unmittelbar nach dem Lauf
Zeitpunkt 2:	15:30 Uhr	6 Stunden nach dem Lauf
Zeitpunkt 3:	21:30 Uhr	12 Stunden nach dem Lauf
Zeitpunkt 4:	9:30 Uhr	24 Stunden nach dem Lauf



**Abbildung 5:** Proband auf Fahrradergometer (Lode Excalibur) am Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes

### 3.1.7.3 Intervalltrainingsstudie

Bei den Teilnehmern der Trainingsstudie des Institutes für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes, Saarbrücken handelte es sich um 10 untrainierte Probanden mittleren Alters (Geschlecht männlich/weiblich=2/8, Durchschnittsalter  $44 \pm 2,6$  Jahre, durchschnittlicher BMI  $24 \pm 3$  kg/m<sup>2</sup>, VO<sub>2</sub>max <50ml/min/kg) ohne behandlungsbedürftige Erkrankungen und ohne Medikation (**Tabelle 3**). Die Probanden waren zu Studienbeginn mindestens seit 6 Monaten ohne ausdauerwirksames Training und zu keiner Zeit ihres Lebens leistungssportlich aktiv.

Nach einem Eingangstest (EKG, Laufbandergometrie zur Bestimmung von HFmax) gestaltete sich der Ablauf des dreimonatigen Intervalltrainings wie folgt:

Die Probanden trainierten dreimal wöchentlich nach der „4x4“-Methode (Helgerud & Hoff, 2004). Der Trainingsablauf bestand aus einem fünfminütigen Aufwärmen (Laufen/Gehen bei 65-75% der maximalen Herzfrequenz), 4 vierminütigen Intervallläufen (Laufen bei 80-90% der maximalen Herzfrequenz) und einem dreiminütigen Auslaufen bei 65-75% der maximalen Herzfrequenz. Zwischen den



vierminütigen Intervallen liefen die Probanden 3 Minuten bei 65-75% der maximalen Herzfrequenz.

Die venösen Blutentnahmen erfolgten zu vier verschiedenen Zeitpunkten:

Zeitpunkt 1a: unmittelbar vor dem ersten Lauf

Zeitpunkt 1b: unmittelbar nach dem ersten Lauf

Zeitpunkt 2a: unmittelbar vor dem letzten Lauf

Zeitpunkt 2b: unmittelbar nach dem letzten Lauf

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellisolation (MNCs)**

#### **3.2.1.1 Blut-Ficoll**

Sowohl den Waldläufern als auch den Teilnehmern der Trainingsstudie wurden pro Zeitpunkt jeweils 40 ml Citratblut durch Punktion einer Ellenbeugenvene entnommen. Anschließend erfolgte sofort die Isolation der mononukleären Zellen (MNC) mithilfe der Biocoll Separating Solution mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation. Die MNC-Fraktion besteht aus den Lymphozyten, Monozyten, Stammzellen und Resten von Granulozyten.

Zuerst wurden jeweils 20 ml Citratblut in zwei 50 ml Falcons überführt, welche mit 1x PBS auf 35 ml aufgefüllt wurden. Anschließend wurde dieses Blut-PBS-Gemisch vorsichtig in zwei weitere 50 ml Falcons übergeschichtet, in die man zuvor jeweils 15 ml Biocoll Separating Solution vorgelegt hatte. Nun erfolgte die Auftrennung der einzelnen Phasen mittels Zentrifugation für 20 Minuten bei 2400 rpm unter Ausschaltung der Bremse, sodass die Zentrifuge für weitere 20 Minuten auslaufen konnte. Nach Ende der Zentrifugation waren im Falcon vier Phasen erkennbar. Ganz oben das Serum, dann eine milchige Phase, die die mononukleären Zellen beinhaltete, die Biocoll Separating Solution und ganz unten die Erythrozyten (**Abb. 6**). Die Phase mit den MNC wurde in einem weiteren Schritt vorsichtig abpipettiert, ohne die Erythrozyten einzusaugen und in ein neues 50 ml Falcon überführt, welches anschließend mit 1x PBS auf 50 ml aufgefüllt und für weitere 10 Minuten bei 2400 rpm (mit Bremse) zentrifugiert wurde. Nun bildeten sich am Boden der zwei Falcons pro Proband und Zeitpunkt Zellpellets, welche in je 10 ml 1x PBS resuspendiert und dann zu einer gemeinsamen Zellsuspension gepoolt



wurden. Diese Suspension wurde erneut mit 1x PBS auf 50 ml aufgefüllt und in einem weiteren Schritt bei 2400 rpm (mit Bremse) 10 Minuten zentrifugiert.

Das letztendlich entstandene Zellpellet wurde mit 7 ml 1x PBS resuspendiert. Die Anzahl der isolierten Zellen wurde mithilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt. Dazu wurden 10 µl der Suspension mit 40 µl Trypanblau vermischt und 9 µl davon in der Zählkammer eingesetzt. Die Zellsuspension wurde dann auf folgende Reaktionsgefäße verteilt:

1 ml zur CHAPS-Isolation

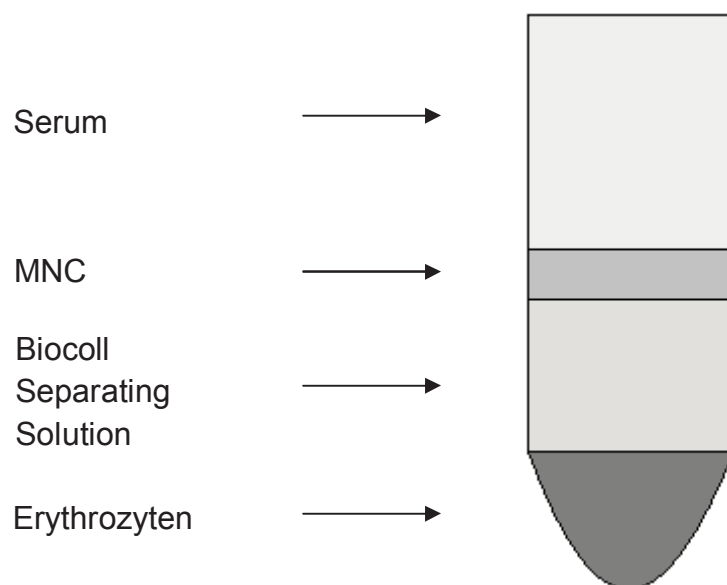
2 ml zur Protein-Isolation

2 ml zur RNA-Isolation

1 ml zur Reserve (Kryotube, im RPMI160 Medium + 5% DMSO, ad -80 °C)

1 ml zur Zellzählung

Anschließend wurden die jeweiligen Suspensionen mit einer Tischzentrifuge 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, die Überstände entfernt und die nun entstandenen Pellets in den entsprechenden Lysepuffern und Einfriermedien weiterverarbeitet (s.u.).



**Abbildung 6:** Darstellung der MNC-Isolation mittels Biocoll Separating Solution

### **3.2.1.2 Milz-Ficoll**

Nachdem die Milzen den Mäusen entnommen wurden, wurden sie jeweils in einem 15 ml Falcon mit steriler Kochsalzlösung auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Milzen in jeweils 15 ml Milzpuffer ausgestrichen, resuspendiert und über einen Zellfilter zum Abfangen von Pulparesten in einen 50 ml Falcon filtriert, welcher mit 1x PBS steril auf 35 ml aufgefüllt wurde. In einen zweiten Falcon wurden 15 ml der Biocoll Separating Solution vorgelegt, die mit dem Milz-PBS-Gemisch aus dem ersten Falcon überschichtet wurde. Anschließend wurde dieses Falcon bei 2400 rpm für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach Ende der Zentrifugation wurde die mittlere milchige Schicht (s.o. und Abbildung) abpipettiert und in ein drittes Falcon gegeben, das auf 40 ml mit 1x PBS steril aufgefüllt wurde. Diesem Schritt schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 2400 rpm und 20 min, dieses Mal mit Bremse, an. Nach Ende des zweiten Zentrifugationsschrittes wurde der Überstand abgegossen und das Falcon kurz über Kopf auf Zellstoff abgetropft. Das Pellet, welches sich am Boden des Falcons gebildet hatte, wurde nun in 1 ml 1x PBS steril resuspendiert. Die Suspension wurde für die weiteren Isolationsschritte wie folgt auf die vorbereiteten Reaktionsgefäße verteilt:

500 µl zur Protein-Isolation

250 µl zur CHAPS-Isolation

250 µl zur DNA-Isolation

Anschließend wurden die jeweiligen Suspensionen mit einer Tischzentrifuge 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert, die Überstände entfernt und die nun entstandenen Pellets in den entsprechenden Lysepuffern und Einfriermedien weiterverarbeitet (s.u.).

Die Anzahl der isolierten Zellen wurde wie bei der Isolation der menschlichen MNCs mit der Neubauer Zählkammer ermittelt.

## **3.2.2 RNA-Isolation, Reverse Transkription der RNA und Polymerase-Kettenreaktion**

### **3.2.2.1 RNA-Isolation**

Das Zellpellet aus der Zellisolation wurde in 1 ml peqGOLD RNAPure gelöst und bei -80 °C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bis zur Verwendung eingefroren. Zur RNA-Isolation

wurden die Lysate unter dem Abzug aufgetaut, mit 300 µl Chloroform überschichtet und mit dem Vortexer gut gemischt, bis das Lysat trüb wurde. Nachdem die Probe bei 4 °C und 14.000 rpm für 15 bis 30 Minuten zentrifugiert wurde, bildeten sich drei Phasen. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, mit 400 µl Isopropanol versetzt, gevortext und anschließend mindestens eine Stunde bei -80 °C gelagert um die RNA-Ausfällung zu optimieren. Nach erneutem Zentrifugieren für eine Stunde bei 4 °C und 14.000 rpm, wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 750 µl kaltem Ethanol/DEPC (75 ml Ethanol + 25 ml DEPC) resuspendiert. DEPC-Wasser enthält Diäthylpyrocarbonat (DEPC, 1 ml/l), diese Chemikalie hemmt ubiquitär vorhandene RNAsen. DEPC-Wasser ist also RNA-freies Wasser. Anschließend wurde die Isolation mit einem erneuten Zentrifugationsschritt für 15 min bei 14.000 rpm fortgesetzt. Unter Berücksichtigung des nicht am Boden haftenden Zellpellets, wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet bei Raumtemperatur unter dem Abzug offen trocknen gelassen. Je nach Pelletgröße wurde mit 20-30 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Das Lysat wurde nun bei -80 °C gelagert.

### **3.2.2.2 Reverse Transkription (RT)**

Nach Messung der Gesamt-RNA mit dem UV-Photometer wurde das Volumen für 2 µg der Gesamt-RNA ausgerechnet und auf 10 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Unter Verwendung des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits erfolgte nun die cDNA-Herstellung für die anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu wurden jeweils die 10 µl der verdünnten Proben mit 10 µl Mastermix (2 µl 10x Buffer RT, 0,8 µl dNTP Mix, 2 µl RT Random Primer, 1 µl Reverse Transkriptase, 1 µl RNase Inhibitor, 3,2 µl DEPC-Wasser) vermischt. Anschließend wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C im Wasserbad erhitzt. Durch eine weitere Erhitzung des Lysates für 5 min auf 93 °C wurde schließlich die Reverse Transkriptase inaktiviert. Die so synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### **3.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (semiquantitativ)**

Nach erfolgreicher Isolation der Gesamt-RNA und Reverser Transkription erfolgte nun die Polymerase-Kettenreaktion. Zu 1 µl cDNA wurden 19 µl Mastermix pipettiert:

15,7 µl Aqua dest.

2 µl 10x Reaction Buffer Y  
0,3 µl Primer forward (fw)  
0,3 µl Primer reverse (rev)  
0,5 µl DNTP-Mix (Nukleotide)  
0,2 µl Taq-DNA-Polymerase

Nach Vortexen und Herabzentrifugieren der mit dem Mastermix verdünnten Proben, wurden diese in den ThermoCycler gestellt und folgende Reaktionsschritte durchlaufen:

1. Denaturierung bei 95 °C für 5 min
2. PCR-Zyklus bei Primer-Annealing-Temperatur (s.o.) für 60 s,  
danach bei 72 °C für 90 s  
und bei 95 °C für 60 s (Denaturierung)
3. 72 °C für 10 min
4. Abkühlen auf 4 °C

Um nun die Expressionsunterschiede der untersuchten Faktoren auf mRNA-Ebene beurteilen zu können, wurde ein DNA-Gel (Herstellung s.o.) angefertigt und 20 µl PCR-Produkt mit 5 µl Ladepuffer aufgetragen und mit 90 V für 30-45 min laufengelassen. Unter dem UV-Licht wurden die Banden beurteilt und fotografiert. Im Anschluss erfolgte die densitometrische Auswertung mit der Labworks-Software. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Housekeeping-Gen bzw. Ladekontrolle verwendet.

### **3.2.3 Western Blot**

#### **3.2.3.1 Allgemeines zum Western Blot-Verfahren**

Der Western Blot ist eine Methode um die Proteinexpression mithilfe spezifischer Primärantikörper und dagegen gerichteter Sekundärantikörper, die Peroxidase-vermittelt Chemolumineszenz auslösen, zu messen.

### **3.2.3.2 Proteinisolation**

Die Proteine wurden mithilfe eines jeweils frisch angesetzten Lysepuffers isoliert. Handelte es sich um Gewebe der Mäuse (Herz, Aorta, Leber) wurde zunächst ein Gewebestück der bei -80 °C gelagerten Organe auf Trockeneis abgetrennt und mit dem Potterstab zertrümmert. Dazu wurden pro Zellpellet bzw. Gewebestück 200(-400) µl Lysepuffer verwendet:

Pro ml Lysepuffer:

1 µl PMSF

1 µl Leupeptin

0,8 µl Aprotinin

(Herstellung s.o.)

Das Zell-Lysepuffer-Gemisch wurde für 5 Minuten bei 95 °C gekocht und bei 2500 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurden die Überstände abgenommen und langfristig bei -20 °C gelagert.

### **3.2.3.3 Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Lysaten erfolgte nach der kalorischen Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951). Es erfolgte eine Dreifachbestimmung um die Messgenauigkeit zu optimieren, d.h. pro Probe wurden drei Reaktionsgefäße vorbereitet. Dazu wurden die Proben wie folgt verdünnt:

18 µl Aqua dest.

2 µl Probe

100 µl Protein-Assay Reagent A

800 µl Protein-Assay Reagent B

Zusätzlich wurde ein Reaktionsgefäß mit 20 µl Aqua dest. vorbereitet, welches als Leerwert diente (10 µl Aqua dest, 100 µl Protein-Assay Reagent A, 800 µl Protein-Assay Reagent B). Alle Proben wurden nach Verdünnung gut gevortext und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Proteinbestimmung nach Lowry wird im ersten Schritt aus Proteinlysate und Protein-Assay Reagent A ein Kupfer-Protein-Komplex in

alkalischer Lösung gebildet. Dieser Komplex reduziert ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Protein-Assay Reagent B), wobei sich die Lösung je nach Proteinkonzentration weniger oder mehr blau färbt. Die Absorption der Lösung wird mit einem Photometer bei 540 nm quantifiziert.

#### **3.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zum Vergleich der Expression der Zielproteine wurden je nach Proteinkonzentration 40-100 µg der Proteine mit einer entsprechenden Menge an Ladepuffer (Ansatz s.o.) verdünnt, auf ein 8-12%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch bei 30 mA aufgetrennt. Das noch flüssige Trenngel (Ansatz s.o.) wurde dazu mit einer Pipette zwischen zwei eingespannten Glasplatten gebracht und mit einer dünnen Schicht Aqua dest., überschichtet, sodass es nicht austrocknen konnte. Nach ca. 15 Minuten war das Trenngel ausgehärtet, die Aqua dest.-Schicht konnte abgekippt werden und das frisch zubereitete Sammelgel (Ansatz s.o.) konnte mithilfe einer Pipette zugegeben werden. Für die Slots, um die mit Ladepuffer versetzten Proteine einfüllen zu können, wurde ein Slotkamm in das Sammelgel eingeführt. Das Erhärten des Sammelgels dauerte wiederum ca. 15 min. Währenddessen wurden die Proben auf Eis aufgetaut, mit dem Ladepuffer gut durchmischt und bei 70 °C im Heizblock für 7 min denaturiert. Nachdem das Gel vollständig ausgehärtet war, wurde der Kamm entfernt und die Slots mit Aqua dest. gut durchspült. Das Gel wurde nun in eine Elektrophoresekammer gestellt, die mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt wurde. Anschließend wurden die Proben in die Slots mit Hilfe einer Glaspipette pipettiert, die Elektrophoresekammer mit dem Powerpack verbunden, um dann bei 30 mA für ca. 2-3 h zu laufen. In einem Slot jedes Gels befand sich ein Kaleidoskop-Proteinmarker, dieser diente als Größenstandard, um die Proteine später zuordnen zu können.

#### **3.2.3.5 Proteintransfer**

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen („Blotten“). Dies erfolgte mit Hilfe eines Transferpuffers (Ansatz s.o.), Extra Thick Blot Paper sowie der Blotkammer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) bei ca. 45 min und 200 mA. Dazu wurden die Filter und Membranen auf die Größe des Gels zugeschnitten und zusammen mit dem Gel in Transferpuffer eingeweicht. Zuerst wurde der erste eingeweichte Filter in die

Blotkammer gelegt und sorgfältig glattgestrichen, sodass sich keine Luftblasen bilden konnten. Danach wurde der Filter mit der Nitrozellulosemembran bedeckt, die ebenfalls glattgestrichen wurde. Auf die Membran wurde wiederum das Trenngel gelegt, welches zuvor vorsichtig aus den Glasplatten gelöst, vom Sammelgel befreit und ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht wurde. Nachdem auch das Gel glattgestrichen wurde, wurde zuletzt der zweite Filter auf das Gel gelegt, glattgestrichen, der Deckel der Blotkammer verschlossen und mit dem Powerpack verbunden. Nach dem Blot-Vorgang wurde die Nitrozellulose-Membran mit den übertragenen Proteinen aus der Kammer entnommen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer 5%-igen Lösung aus Trockenmilch und PBS-Tween (Ansatz s.o.) langsam geschüttelt, um freie Oberflächenbindungsstellen zu blockieren.

### **3.2.3.6 Antikörperinkubation**

Zur Expressionsbestimmung der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4 °C mit einem Primärantikörper (s.o.) auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Dazu wurden die Antikörper mit einer 1%-igen Lösung aus Trockenmilch und PBS-Tween verdünnt (s.o.). Um Proteine zu sparen, wurden wo passend die Membranen zwischen den gewünschten Targets (z.B. zwischen p16 und p53) durchgeschnitten und die beiden Stücke getrennt in verschiedene Falcons mit den jeweiligen Antikörper-Milch-Gemischen gebracht.

Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen aus den Falcons entfernt, die nichtgebundenen Antikörper mit 1x PBS-Tween-Puffer abgewaschen und die Membran mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (s.o.) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 1x PBS inkubiert. Danach wurden wieder die nichtgebundenen Antikörper mit 1x PBS-Tween abgewaschen.

Waschschritte der Membran:

2 x 5 min waschen mit 1x PBS-Tween

2 x 10 min waschen mit 1x PBS-Tween

1 x 3 min waschen mit 1x PBS

1 x 5 min waschen mit 1x PBS

30 min mit Sekundärantikörper inkubieren

2 x 5 min waschen mit 1x PBS-Tween

2 x 10 min waschen mit 1x PBS-Tween

1 x 3 min waschen mit 1x PBS

1 x 5 min waschen mit 1x PBS

### **3.2.3.7 Entwickeln**

Mithilfe des ECL-Kits wurden die an die Proteinbanden gebundenen Antikörper auf einem Amersham Hyperfilm ECL sichtbar gemacht. Es wurden 5 ml ECL Lösung 1 mit 5 ml ECL Lösung 2 vermischt, die Membran damit überschichtet und für 1 min bei Raumtemperatur und abgeschaltetem Licht (ECL=lichtempfindlich) inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt, glattgestrichen und in die Entwicklerkassette gelegt.

In der Dunkelkammer wurde der Film dann zugeschnitten und auf die Membran in die Entwicklerkassette gelegt, die danach verschlossen wurde, sodass der Film belichtet werden konnte. Die Belichtungszeiten variierten je nach Antikörper. Während bei der GAPDH nur eine sehr kurze Belichtungszeit von 1 s benötigt wurde, konnte es bei z.B. schwächer exprimierten Proteinen wie p16 bis zu 30 min dauern, um eine Bande zu detektieren. Nachdem die jeweilige Belichtungszeit abgelaufen war, wurde die Kassette unter Speziallicht geöffnet, der Film in die Entwicklmaschine gelegt und bei zufrieden stellendem Ergebnis mithilfe der Labworks-Software ausgewertet.

Die densitometrischen Ergebnisse für die Zielproteine wurden in jeder Probe auf das Housekeeping-Protein GAPDH bezogen, um Beladungsunterschiede zu berücksichtigen. Die in Kap. 4 gezeigten Ergebnisse sind der Quotient der Bande des Zielproteins und der jeweiligen GAPDH \*100 und daher einheitenlos.

## **3.2.4 Telomerlängenmessung mittels Real-Time-PCR**

### **3.2.4.1 Allgemeines**

Mit Hilfe der genomischen DNA kann die Bestimmung der Telomerlänge mittels Real-time PCR erfolgen. Die Telomer-DNA und das Single Copy Gen 36b4 werden mittels spezifischer Primer amplifiziert, die Menge an Telomer-DNA bzw. 36b4-DNA in Bezug gesetzt und die experimentellen Gruppen dann verglichen. Bei dieser Methode handelt es sich also um die Messung von relativen Telomerlängenunterschieden.



### **3.2.4.2 DNA-Isolation**

#### **3.2.4.2.1 DNA-Isolation aus mononukleären Zellen (MNC)**

Das bei der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation im Rahmen der MNC-Isolation aus Mäusemilzen entstandene Pellet wurde nach Zentrifugation in 200 µl 1x PBS gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolation der genomischen DNA der Zellen mithilfe des QIAamp DNA Mini Kit (50) (Qiagen) gestaltete sich wie folgt:

- Pellet mit 200 µl 1x PBS
  - + 20 µl Proteinase → mischen
  - + 200 µl Buffer AL
  - 15 s vortexen und runterzentrifugieren
  - 10 min in Heizblock bei 56 °C und runterzentrifugieren
  - + 200 µl Ethanol absolut
  - 15 s vortexen und runterzentrifugieren
- Mix in Säule pipettieren
  - 1 min bei 9000 rpm zentrifugieren
- Säule vom Eppli abnehmen, Filtrat verwerfen, Säule wieder aufsetzen
  - + 500 µl Buffer AW1
  - 1 min bei 9000 rpm zentrifugieren
- Säule in neues Eppli, Filtrat verwerfen
  - + 500 µl Buffer AW2
  - 3 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Säule in neues Eppli, Filtrat verwerfen
  - 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Säule in 1,5 ml Eppli, Filtrat verwerfen
  - + 50 µl Buffer AE
  - 1 min bei 9000 rpm zentrifugieren
- Säule verwerfen
- DNA bei -20 °C lagern

#### **3.2.4.2.2 DNA-Isolation aus Gewebe**

Die Isolation der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit (50) (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers in ähnlicher Weise wie bei der Isolation aus Zellen.

Abfolge:

- Gewebestück (Herz, Aorta, Leber) in 80 µl 1x PBS vorsichtig pötern
- + 100 µl Buffer ATL
- + 20 µl Proteinase K
- ➔ 1,5 h in Heizblock bei 56 °C
- ➔ vortexen und runterzentrifugieren
- + 200 µl Buffer AL ➔ vortexen und runterzentrifugieren
- ➔ 10 min in Heizblock bei 70 °C
- + 200 µl Ethanol absolut ➔ vortexen und runterzentrifugieren
- Mix in Säule ➔ 1 min bei 9000 U/min zentrifugieren
- Reaktionsgefäß leeren
- + 500 µl Buffer AW1 ➔ 1 min bei 9000 U/min zentrifugieren
- Säule in neues Qiagen-Reaktionsgefäß
- + 500 µl Buffer AW2 ➔ 3 min bei 13000 U/min zentrifugieren
- Säule in neues Qiagen-Reaktionsgefäß
- ➔ 1 min bei 13000 U/min zentrifugieren
- Säule in vorbereitetes 1,5 ml Reaktionsgefäß
- + 25 µl Buffer AE ➔ 1 min bei 9000 U/min zentrifugieren
- DNA bei -20 °C lagern

### 3.2.4.3 DNA-Bestimmung

Nach der Isolation der DNA wurde deren Konzentration in der Lösung mithilfe des NanoDrop 2000 Spectrophotometers gemessen.

#### 3.2.4.4 Durchführung und Auswertung

Zu 40 ng (80 ng) DNA kamen 22 µl eines Mastermixes:

7,5 µl SYBR Green Mix, 0,075 µl eines telomerspezifischen Primers (s.o.):

forward: CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT;

reverse: GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT

bzw. 0,025 µl des 36b4 Primers (s.o.):

forward: CACACTCCATCATCAATGGGTACAA;

reverse: CAGCAAGTGGGAAGGTGTACTCA

und 14,4 µl PCR-Wasser.

Die Real-Time PCR erfolgte in Doppelbestimmung mit dem Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Deutschland).

### **3.2.5 Telomeraseaktivitätsmessung (TRAP-Assay)**

#### **3.2.5.1 Allgemeines**

Das Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP-Assay) stellt ein Verfahren dar, mit dem man die Telomeraseaktivität sowohl in Zellen als auch in Gewebelysaten messen kann. In dieser Arbeit wurde die Telomeraseaktivität in aus der Milz isolierten mononukleären Zellen (MNC), Herz, Aorta und Leber von Mäusen sowie in aus dem peripheren Blut isolierten MNC von Menschen untersucht.

#### **3.2.5.2 Proteinisolation**

##### **3.2.5.2.1 MNC**

Die MNC-Pellets wurden nach der Ficollisolation (Kap. 3.2.1.2) in 196µl TRAPeze 1x Chaps Lysis Buffer resuspendiert, bei 4 °C für 30 min inkubiert und bei 4 °C und 4000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit 4 µl RNAsin bei -20 °C gelagert. RNAsin war erforderlich, um eine Denaturierung des RNA-Templates der Telomerase durch ubiquitär vorhandene RNAsen zu verhindern.

##### **3.2.5.2.2 Gewebe**

Das jeweilige Gewebestück (Herz, Aorta oder Leber) wurde mit 98 µl TRAPeze 1x Chaps Lysis Buffer versehen und sorgfältig gepottert. Danach wurde das Lysat bei 4 °C für 30 min inkubiert und bei 4 °C und 4000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit 2 µl RNAsin bei -20 °C bis zum Assay gelagert.

#### **3.2.5.3 Messung der Telomeraseaktivität**

Nach Proteinisolation und -bestimmung wurden 10 µg der Probe auf 50 µl mit DEPC-Wasser verdünnt. Nach Vortexen und Zentrifugieren der Proben wurden jeweils 5 µl der Verdünnung (entsprechend 1 µg der Probe) mit 15 µl Mastermix versetzt (10,6 µl PCR-Wasser, 2 µl der Primermischung [5 µl ACX-Primer, 10 µl TS-Primer und 185 µl PCR-

Wasser], 0,4 µl MgCl<sub>2</sub> und 2 µl SYBR Green PCR Master Mix). 1000 HEK293-Zellen dienten als Positiv- und TRAPeze 1x CHAPS Lysis Buffer als Negativkontrolle. Dieses Gemisch wurde in LightCycler Kapillaren pipettiert, bei 3000 rpm kurz zentrifugiert und anschließend in einem Umluftinkubator für 30 min bei 30 °C inkubiert, bei der das Template in Form des ACX-Primers durch die Telomerase verlängert wurde. Danach wurden die Glaskapillaren in den LightCycler überführt und folgendes Programm ausgeführt:

1. Denaturierung von DNA und Telomerase bei 90 °C für 10 min und Aktivierung der im Mastermix enthaltenen DNA-Polymerase.
2. PCR (40 Zyklen), jeweils 20 s bei 95 °C, 30 s bei 60 °C und 50 s bei 72 °C.

Human Embryonic Kidney (HEK) Zellen haben eine hohe Telomeraseaktivität. Es wurde eine Standardkurve von 1000, 500, 250, 128, 64, 32, 8 und 4 HEK-Zellen als Doppelbestimmung amplifiziert. In jedem späteren Lauf mit Proben von Mäusen oder Menschen wurden 1000 HEK-Zellen als Positivkontrolle eingesetzt und das Signal der Zielzellen bzw. -gewebe zu der Standardkurve in Beziehung gesetzt. Die Telomeraseaktivität wurde dann als Äquivalent von HEK293-Zellen angegeben.

### **3.2.6 Statistische Analyse**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von ungepaarten Student-T-Tests für den Vergleich zwischen zwei Gruppen und mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgender Korrektur für Mehrfachvergleiche bei mehr als zwei Gruppen (Bonferroni-Korrektur für post-hoc Tests). Dazu wurde die GraphPad Prism Software, Version 5.0, verwendet. Die Nullhypothese wurde bei einem statistischen Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  abgelehnt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mäuse

#### 4.1.1 Charakteristika der verwendeten Mausgruppen

Bei den in der Studie verwendeten Mausgruppen handelte es sich um vier Gruppen der Linie C57Bl/6, deren Charakteristika in **Tabelle 1** zu sehen sind. Die jungen Mäuse waren bei Beginn der Studie 10 Wochen alt, die alten Tiere im Schnitt fast zwei Jahre alt. Im Gegensatz zu den jungen und alten sitzenden Kontrollmäusen erhielten die Laufgruppen ein Nagerlaufrad für das freiwillige Laufradtraining. Die Auswertung der Kilometerzähler zeigte keinen Unterschied in der Laufstrecke zwischen den jungen und den alten Mäusen. Bei jungen Mäusen hatte das Training keine Auswirkungen auf den Hypertrophieindex, bei alten Tieren gab es einen Unterschied, der aber v.a. auf das unterschiedliche Körpergewicht zurückzuführen ist.

#### 4.1.2 Vergleich der Telomeraseaktivität zwischen verschiedenen Organen bei jungen und alten Mäusen unter dem Einfluss des Lauftrainings

Die Telomerase ist ein Enzym, dessen Aktivität für die Länge der Telomere, die die chromosomale DNA vor Degradation schützen, und für die zelluläre Alterung bedeutsam ist. Um die Telomeraseaktivität in den Organen bei jungen und alten Mäusen zu vergleichen, wurden jeweils Herz, Aorta und Leber entnommen und mittels Telomere Repeat Amplification Protocol (TRAP-Assay) untersucht. Die Ergebnisse wurden als HEK-Äquivalent dargestellt. Hierbei stellte sich heraus, dass bei jungen Mäusen, die Telomerase sowohl in Herz, Aorta und Leber durch ein dreiwöchiges Lauftraining gesteigert wurde (Herz: junge Kontrollen  $100 \pm 29\%$ , junge Läufer  $249 \pm 26\%$ ; Aorta: junge Kontrollen  $127 \pm 33\%$ , junge Läufer  $255 \pm 29\%$ ; Leber: junge Kontrollen  $425 \pm 19\%$ , junge Läufer  $484 \pm 15\%$ ) (**Abb. 7**). Man sah, dass die basale Telomeraseaktivität in Herz und Aorta in den Tieren ungefähr gleich war und in der Leber deutlich höher und durch Lauftraining nicht signifikant zu steigern.

Die sitzenden alten Mäuse hatten im Vergleich zu den sitzenden jungen Mäusen eine höhere myokardiale Telomeraseaktivität, die jedoch durch Lauftraining nicht weiter gesteigert wurde (alte Kontrollen  $174 \pm 19\%$ , alte Läufer  $174 \pm 10\%$ ) (**Abb. 8A**). Im

## Überblick über die Mausgruppen:

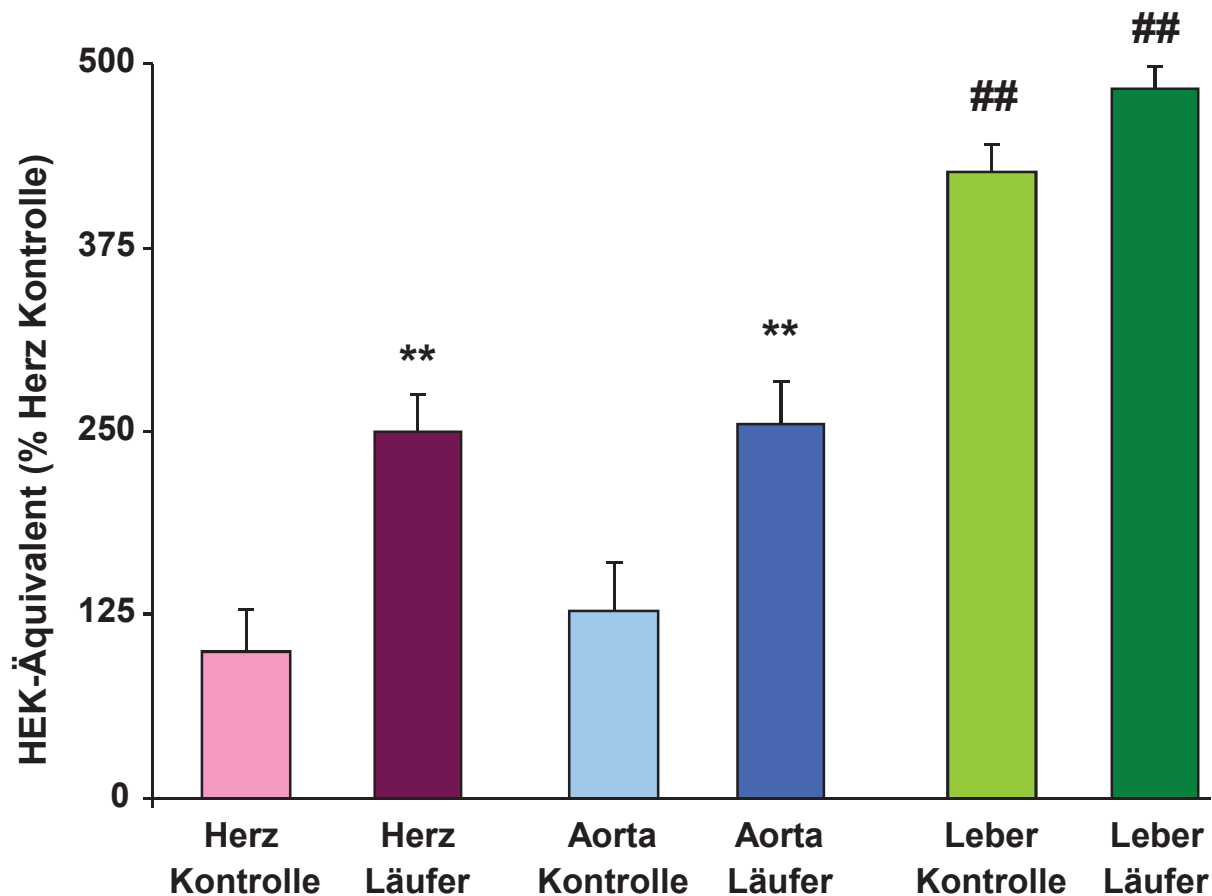
### Junge Mäuse

Gruppe	Junge Kontrollen	Junge Läufer
Anzahl der Tiere (n)	6	6
Alter der Tiere (Mo)	2,5	2,5
Körpergewicht (KG, g)	$23,7 \pm 0,5$	$23,6 \pm 0,3$
Herzgewicht (HG, mg)	$125 \pm 3$	$130 \pm 4$
HG/KG-Index	$0,0053 \pm 0,0001$	$0,0055 \pm 0,0001$
Laufdistanz (km/d)	X	$3,97 \pm 0,79$

### Alte Mäuse

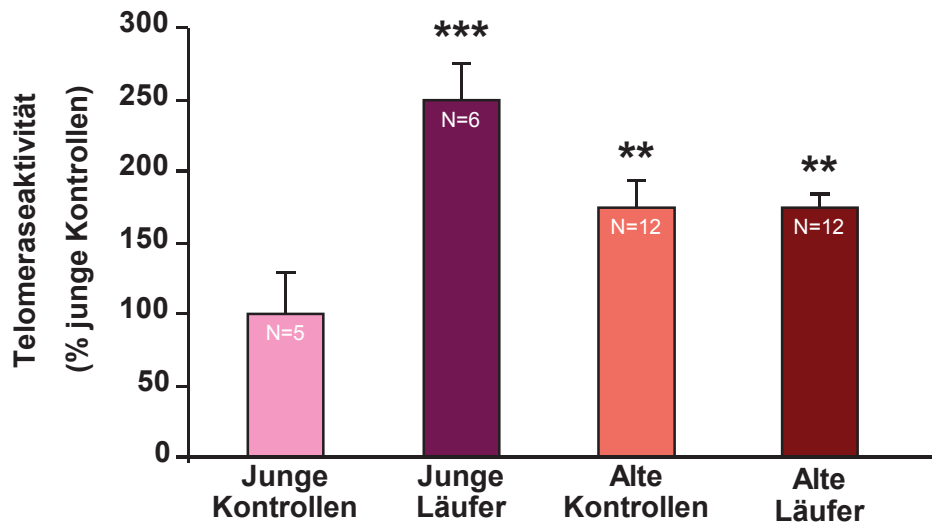
Gruppe	Alte Kontrollen	Alte Läufer
Anzahl der Tiere (n)	12	12
Alter der Tiere (Mo)	$22 \pm 5,2$	$21 \pm 0,5$
Körpergewicht (KG, g)	$35,3 \pm 2,1$	$26,85 \pm 0,8$
Herzgewicht (HG, g)	$169 \pm 10$	$161 \pm 10$
HG/KG-Index	$0,0048 \pm 0,0002$	$0,0061 \pm 0,0002$
Laufdistanz (km/d)	X	$4,12 \pm 0,38$

**Tabelle 1:** Übersicht über die in der Studie verwendeten alten und jungen C57Bl/6-Mäuse, differenziert nach Alter und Kontrollgruppe oder Trainingsgruppe. „Läufer“ führten ein freiwilliges Laufradtraining über drei Wochen durch. Die Bestimmung des Körper- und Herzgewichts erfolgte bei der Organentnahme.

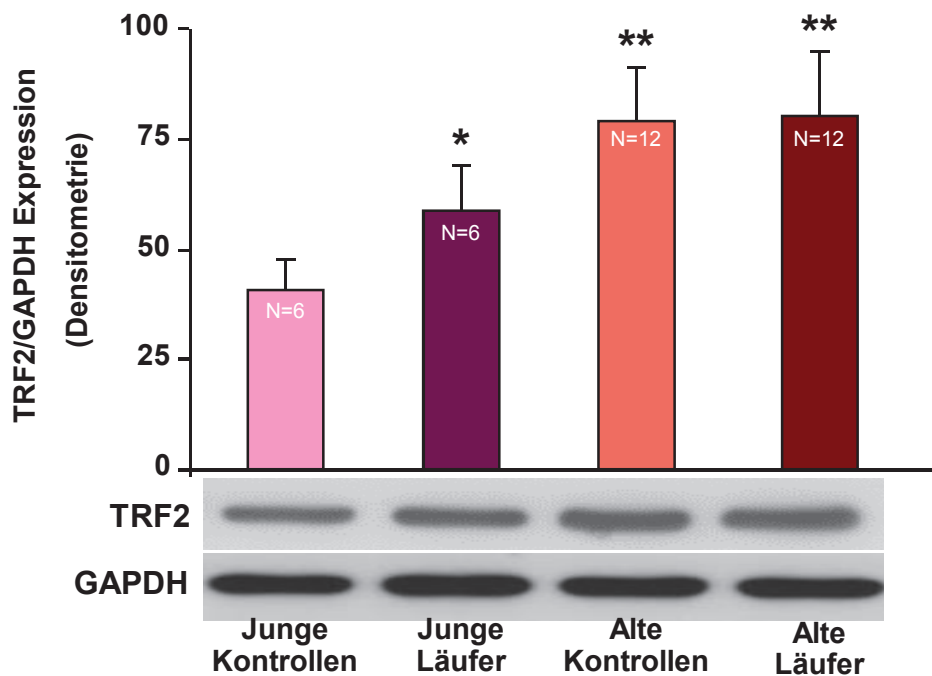


**Abbildung 7:** Telomeraseaktivität, gemessen durch Telomere Repeat Amplification Protocol (TRAP-Assay), im Myokard, der Aorta und der Leber von jungen C57Bl/6-Mäusen mit und ohne freiwilliges Laufradtraining über drei Wochen. N=6. \*\*p<0.01 vs. entsprechende Gewebekontrolle. ##p<0.01 vs. Herz Kontrolle. HEK = Human Embryonic Kidney Cells.

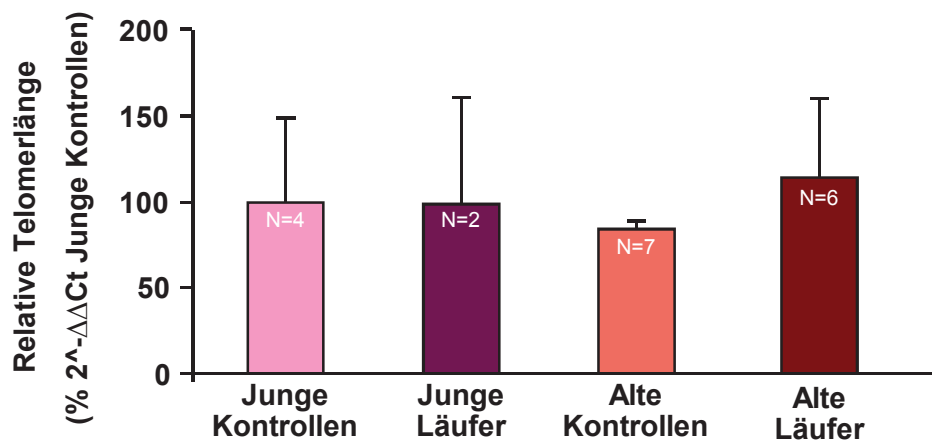
**A**



**B**



**C**



**Abbildung 8:** Einfluss eines dreiwöchigen freiwilligen Laufradtrainings in jungen und alten Mäusen auf die myokardiale (A) Telomeraseaktivität (Telomere Repeat Amplification Protocol), (B) TRF2-Proteinexpression (Western Blot, normalisiert auf das Housekeeping-Protein GAPDH) und (C) relative Telomerlänge (Real-Time PCR auf Telomer-DNA und das Single Copy-Gen 36b4). \*p<0.05, \*\*p<0.01 und \*\*\*p<0.001 vs. junge sitzende Kontrollmäuse.



Aortengewebe zeigte sich bei den alten Mäusen eine basal deutlich höhere Telomeraseaktivität als bei den jungen Tieren, die durch Lauftraining noch weiter gesteigert wurde (alte Kontrollen  $231 \pm 15\%$ , alte Läufer  $321 \pm 25\%$ ) (**Abb. 9A**). In der Leber konnte man bei den alten Mäusen keinen Unterschied zu den jungen Mäusen feststellen, wobei in der Leber im Vergleich zu Herz und Aorta bereits eine basal deutlich höhere Telomeraseaktivität vorlag (s.o.). Lauftraining hatte darüber hinaus keinen signifikanten Effekt auf die Lebertelomeraseaktivität (**Abb. 10A**).

In den im Blut zirkulierenden mononukleären Zellen (MNC) wurde die Telomerase durch ein dreiwöchiges Lauftraining sowohl bei jungen als auch bei alten Mäusen heraufreguliert. Basal war kein Unterschied in der Telomeraseaktivität zwischen jungen und alten Tieren festzustellen (junge Kontrollen  $100 \pm 16\%$ , junge Läufer  $263 \pm 50\%$ , alte Kontrollen  $144 \pm 24\%$ , alte Läufer  $367 \pm 33\%$ ) (**Abb. 11**).

#### 4.1.3 Hochregulation Telomer-regulierender Faktoren

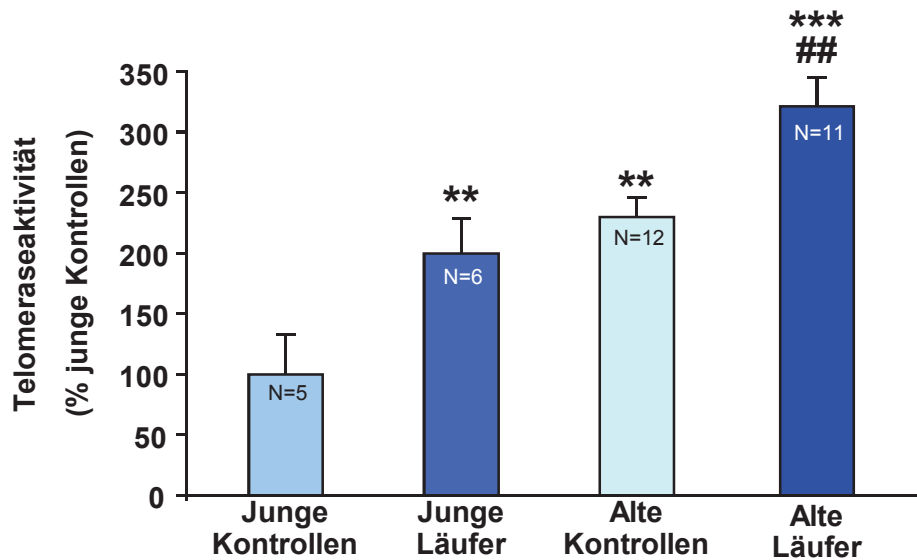
Der Telomere Repeat-Binding Factor 2 (TRF2) dient der Stabilisierung der Telomere, ist bedeutsam für das Zellüberleben und wirkt der Zellalterung entgegen. Die TRF2-Proteinexpression wurde mittels Western Blot in Herz, Aorta und Leber bei jungen und alten Tieren gemessen. Sowohl die myokardiale als auch die aortale TRF2-Proteinexpression wurde bei jungen Tieren durch ein dreiwöchiges Lauftraining hochreguliert (Herz: junge Kontrollen  $41 \pm 7$ , junge Läufer  $59 \pm 10$ ; Aorta: junge Kontrollen  $59 \pm 9$ , junge Läufer  $98 \pm 17$ ). Bei den alten Tieren fand sich bereits basal eine höhere TRF2-Expression, die durch Lauftraining nicht weiter gesteigert wurde (Herz: alte Kontrollen  $79 \pm 12$ , alte Läufer  $80 \pm 15$ ; Aorta: alte Kontrollen  $143 \pm 17$ , alte Läufer  $128 \pm 19$ ) (**Abb. 8B, Abb. 9B**).

Bei der Leber zeigte sich keine Regulation der TRF2-Proteinexpression durch ein Lauftraining. Die hepatische TRF2-Expression war bei alten Tieren im Vergleich zu den jungen deutlich höher (junge Kontrollen  $35 \pm 5$ , junge Läufer  $41 \pm 10$ , alte Kontrollen  $89 \pm 7$ , alte Läufer  $80 \pm 18$ ) (**Abb. 10B**).

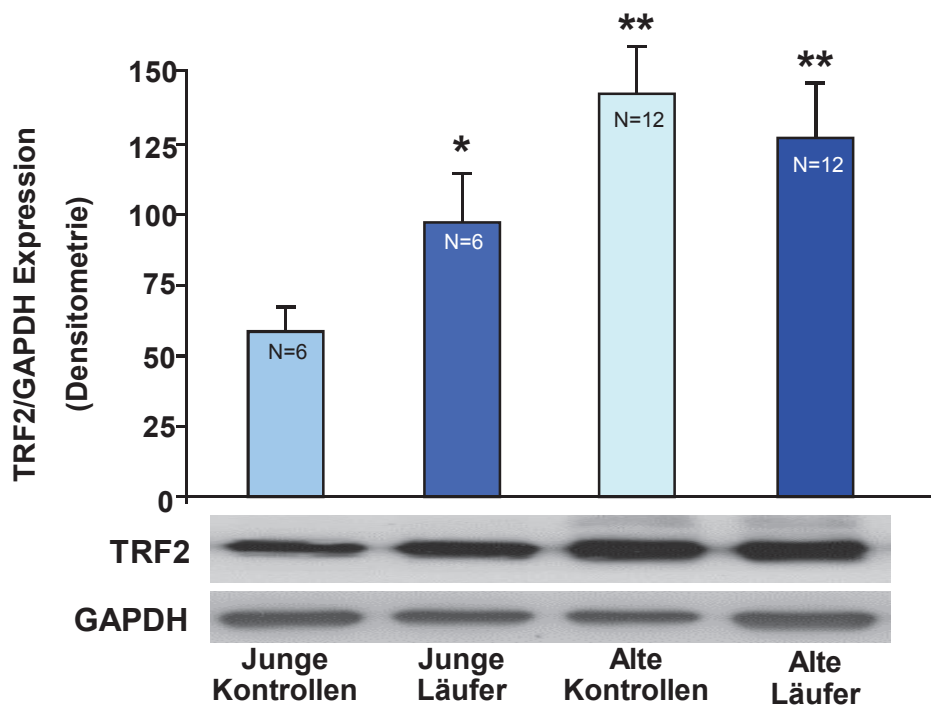
#### 4.1.4 Regulation der Telomerlänge

Mittels Real-Time PCR wurde die relative Telomerlänge bei jungen und alten Mäusen verglichen. Hier stellte sich jedoch kein akuter Effekt eines dreiwöchigen Lauftrainings auf die Telomerlänge dar (Herz: junge Kontrollen  $100 \pm 48\%$ , junge Läufer  $99 \pm 62\%$ , alte

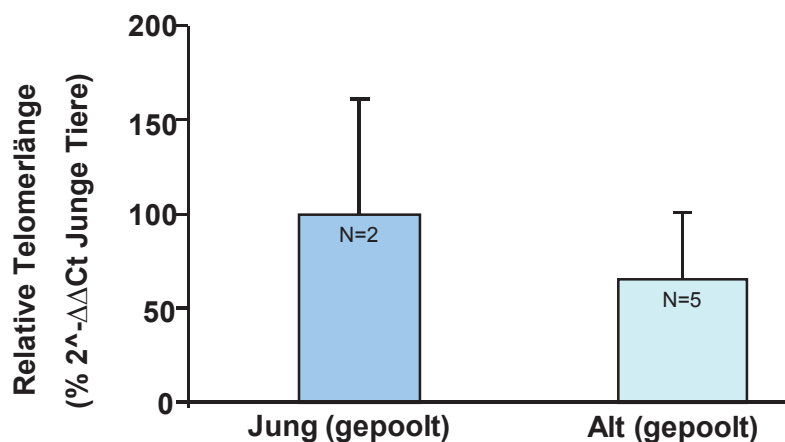
**A**



**B**

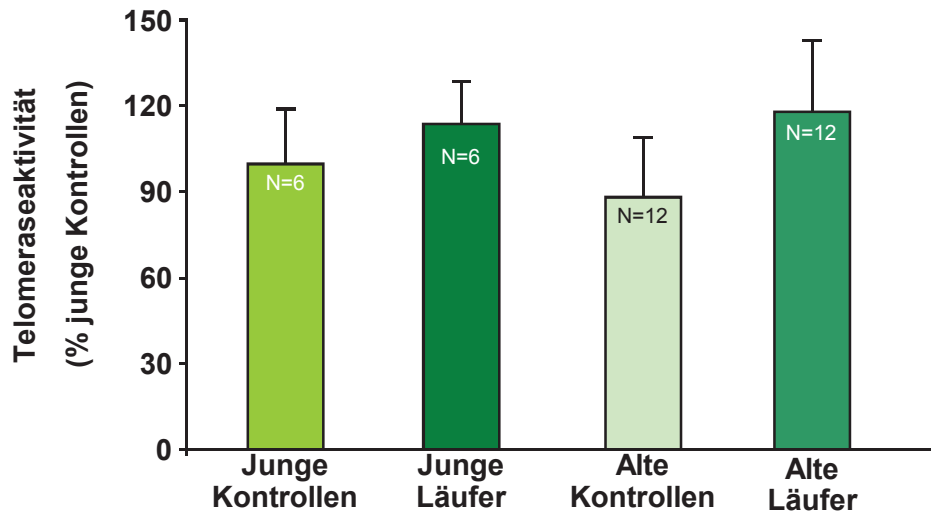


**C**

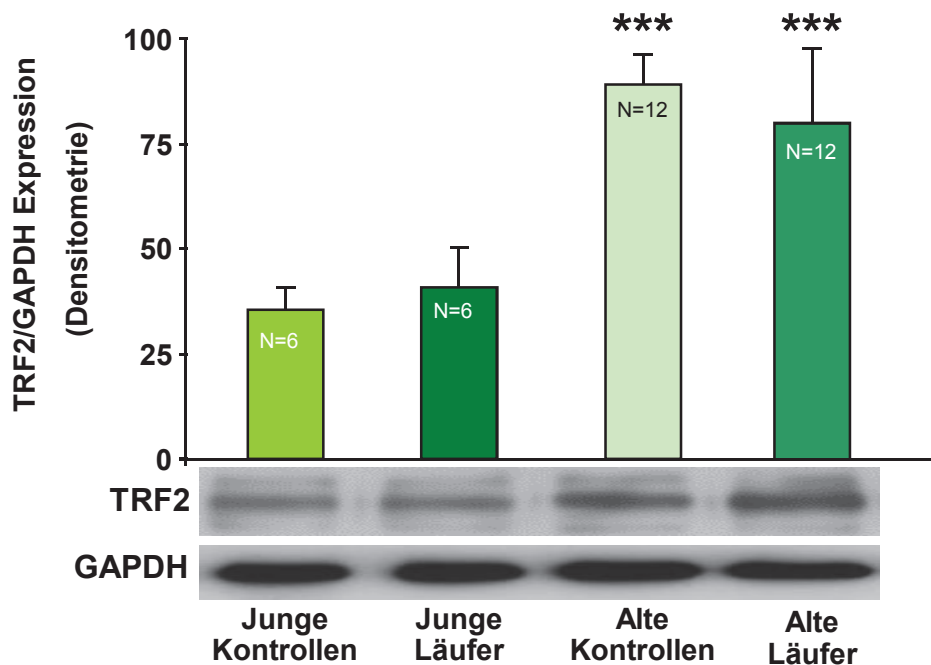


**Abbildung 9:** Einfluss eines dreiwöchigen freiwilligen Laufradtrainings in jungen und alten Mäusen auf die aortale (A) Telomeraseaktivität (Telomere Repeat Amplification Protocol) und (B) TRF2-Proteinexpression (Western Blot, normalisiert auf das Housekeeping-Protein GAPDH). (C) Vergleich der aortalen Telomerlänge (Real-Time PCR auf Telomer-DNA und das Single Copy-Gen 36b4) zwischen jungen und alten Mäusen. \*p<0.05, \*\*p<0.01 und \*\*\*p<0.001 vs. junge sitzende Kontrollmäuse; ##p<0.01 vs. alte sitzende Kontrollmäuse.

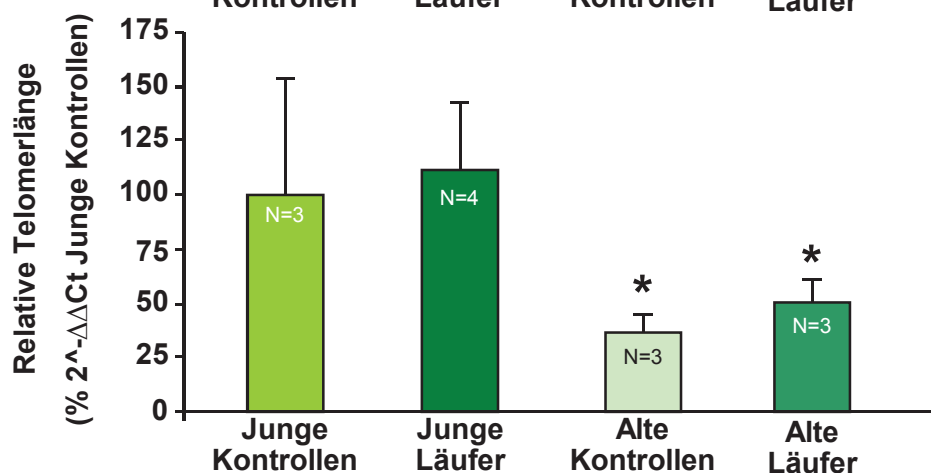
**A**



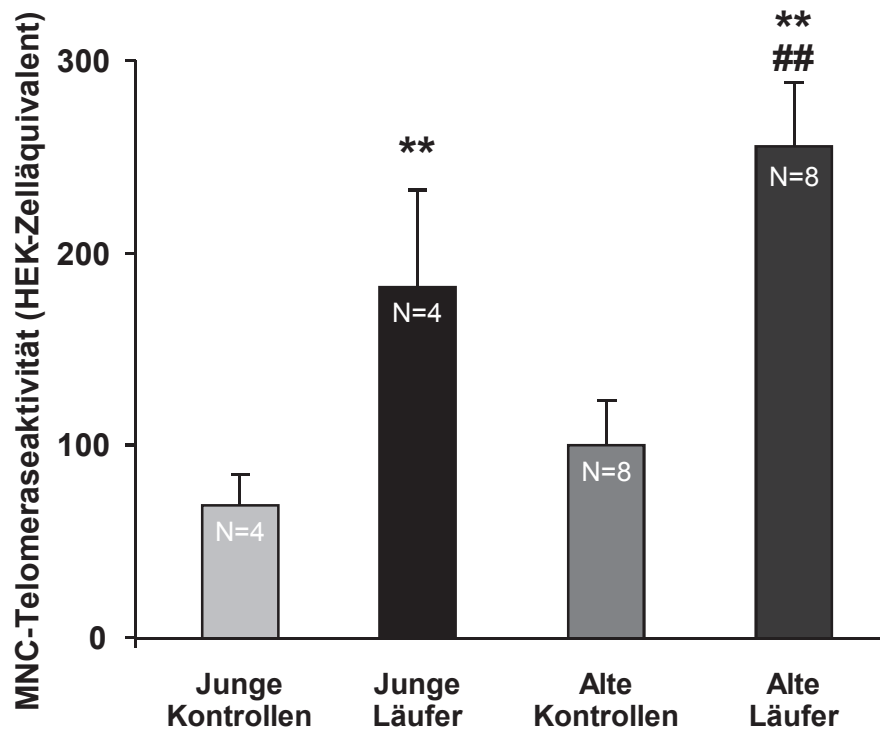
**B**



**C**



**Abbildung 10:** Einfluss eines dreiwöchigen freiwilligen Laufradtrainings in jungen und alten Mäusen auf die hepatische (A) Telomeraseaktivität und (B) TRF2-Proteinexpression (Western Blot, normalisiert auf das Housekeeping-Protein GAPDH). (C) relative Telomerlänge (Real-Time PCR auf Telomer-DNA und das Single Copy-Gen 36b4). \*p<0.05, \*\*p<0.01 und \*\*\*p<0.001 vs. junge sitzende Kontrollmäuse; ##p<0.01 vs. alte sitzende Kontrollmäuse.



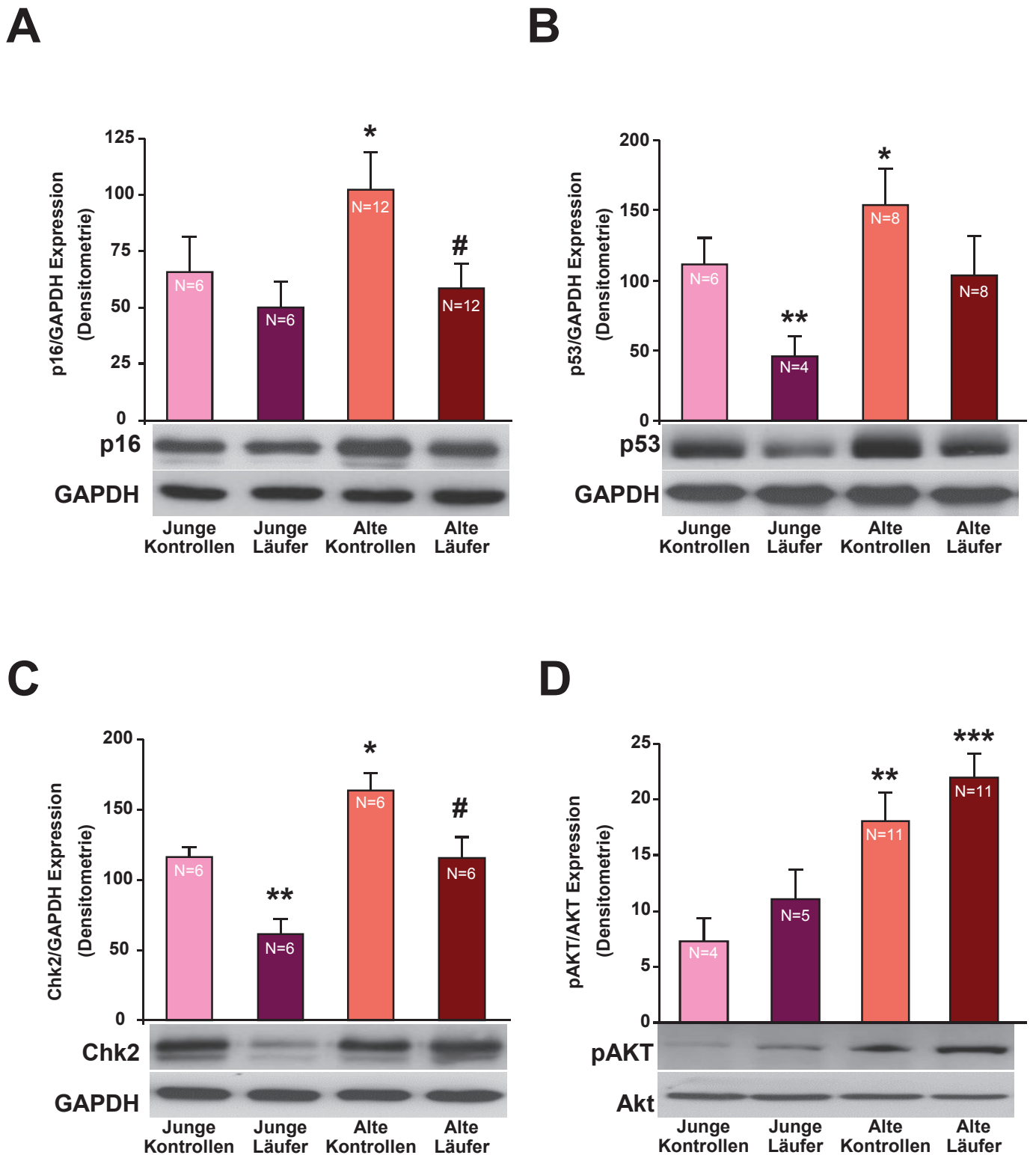
**Abbildung 11:** Einfluss eines dreiwöchigen freiwilligen Laufradtrainings in jungen und alten Mäusen auf die mittels TRAP-Assay (Telomere Repeat Amplification Protocol) gemessene Telomeraseaktivität in aus der Milz isolierten mononukleären Zellen im Vergleich zu HEK-Zellen. \*\* $p < 0.01$  vs. junge sitzende Kontrollmäuse; ## $p < 0.01$  vs. alte sitzende Kontrollmäuse.

Kontrollen  $84\pm5\%$ , alte Läufer  $114\pm45\%$ ). Auf Grund von Schwierigkeiten bei der Bestimmung der aortalen Telomerlänge konnten hier nur junge mit alten Tieren verglichen werden und es gab ähnlich dem Herzgewebe keinen Unterschied zwischen jungen und alten Tieren (**Abb. 8C, 9C**). Im Lebergewebe fanden sich deutlich kürzere Telomere bei den alten Tieren, die Telomerlänge wurde durch das Lauftraining nicht verändert (Leber: junge Kontrollen  $100\pm54\%$ , junge Läufer  $112\pm30\%$ , alte Kontrollen  $37\pm8\%$ , alte Läufer  $51\pm10\%$ ) (**Abb. 10C**).

#### **4.1.5 Regulation der Seneszenzmarkerproteine und Zellzyklusregulatoren p16, p53, Chk2 und pAKT durch Alter und körperliche Aktivität**

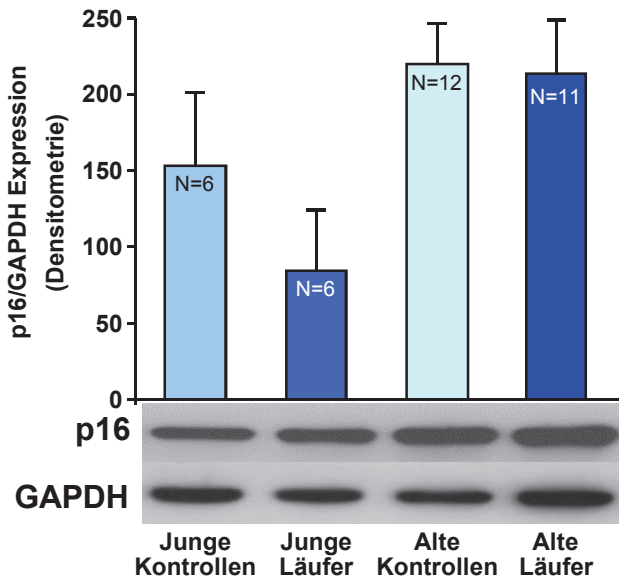
Das Seneszenzmarkerprotein p16 spielt eine wichtige Rolle für die zelluläre Alterung. Die Expression von p16 wurde anhand von Western Blots in Herz, Aorta und Leber von jungen und alten Tieren verglichen. Hierbei wurde eine Herabregulation im Herzen bei jungen Tieren durch Training beobachtet. Bei den alten Tieren war p16 basal höher als bei den jungen, wurde jedoch durch Lauftraining ebenfalls reduziert (junge Kontrollen  $66\pm15$ , junge Läufer  $50\pm12$ , alte Kontrollen  $102\pm17$ , alte Läufer  $59\pm11$ ) (**Abb. 12A**). In der Aorta wurde ebenfalls die p16-Aktivität bei jungen Tieren durch Training reduziert. Basal war die p16-Aktivität bei den alten Tieren ebenso wie im Herzen erhöht, wurde hier jedoch durch ein dreiwöchiges Lauftraining nicht verändert (junge Kontrollen  $153\pm48$ , junge Läufer  $85\pm39$ , alte Kontrollen  $220\pm27$ , alte Läufer  $214\pm35$ ) (**Abb. 13A**). In der Leber wurde keine Regulation von p16 durch Laufen beobachtet. Die p16-Expression war ebenso wie in Herz und Aorta bei alten Tieren basal erhöht (junge Kontrollen  $11\pm4$ , junge Läufer  $13\pm6$ , alte Kontrollen  $50\pm12$ , alte Läufer  $36\pm10$ ) (**Abb. 14A**).

Der Zellzyklus- und Apoptoseregulator p53 und der DNA-Schadensindikator Chk2 wurden in Herz und Aorta bei jungen Mäusen durch Training reduziert. Bei den alten Tieren waren p53 und Chk2 basal höher als bei den jungen und wurde durch das dreiwöchige Lauftraining auf das Niveau der jungen, untrainierten Mäuse reduziert (Herz p53: junge Kontrollen  $111\pm19$ , junge Läufer  $45\pm14$ , alte Kontrollen  $154\pm25$ , alte Läufer  $103\pm29$ ; Herz Chk2: junge Kontrollen  $117\pm40$ , junge Läufer  $62\pm20$ , alte Kontrollen  $163\pm29$ , alte Läufer  $116\pm33$ ; Aorta p53: junge Kontrollen  $105\pm16$ , junge Läufer  $51\pm13$ , alte Kontrollen  $140\pm27$ , alte Läufer  $100\pm22$ ; Aorta Chk2: junge Kontrollen  $69\pm21$ , junge Läufer  $34\pm10$ , alte Kontrollen  $129\pm23$ , alte Läufer  $97\pm22$ ) (**Abb. 12B+C**,

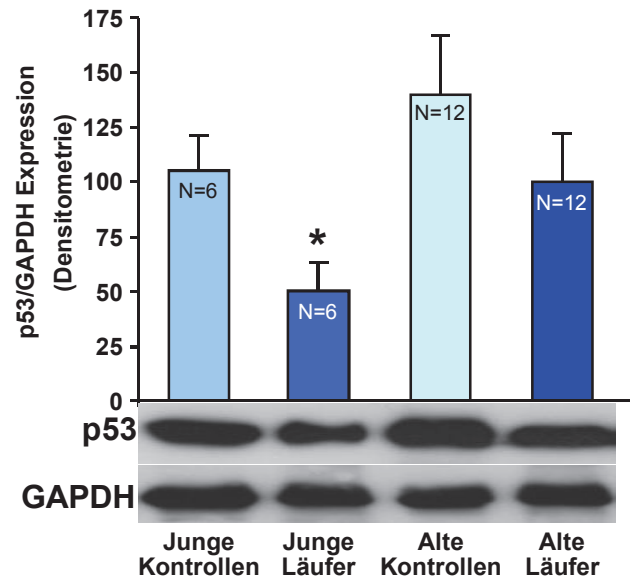


**Abbildung 12:** Einfluss eines dreiwöchigen freiwilligen Laufradtrainings in jungen und alten Mäusen auf die myokardiale Expression von Seneszenzproteinen und Zellzyklusregulatoren. Gezeigt sind (A) das Seneszenzmarkerprotein p16, (B) der Zellzyklusregulator und Apoptose-induktor p53, (C) der DNA-Schadensindikator Chk2 und (D) das anti-apoptotische Protein phospho-AKT, bezogen auf Gesamt-Akt. Western Blots, normalisiert auf das Housekeeping-Protein GAPDH. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.001$  vs. junge Kontrollen, # $p < 0.05$  vs. alte Kontrollen.

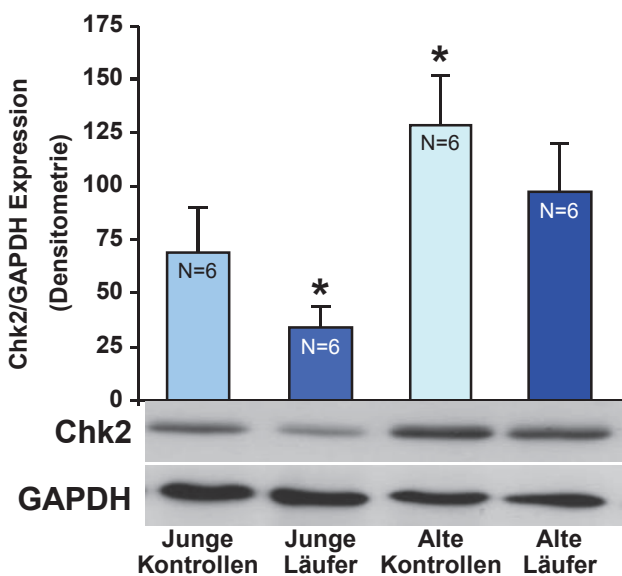
**A**



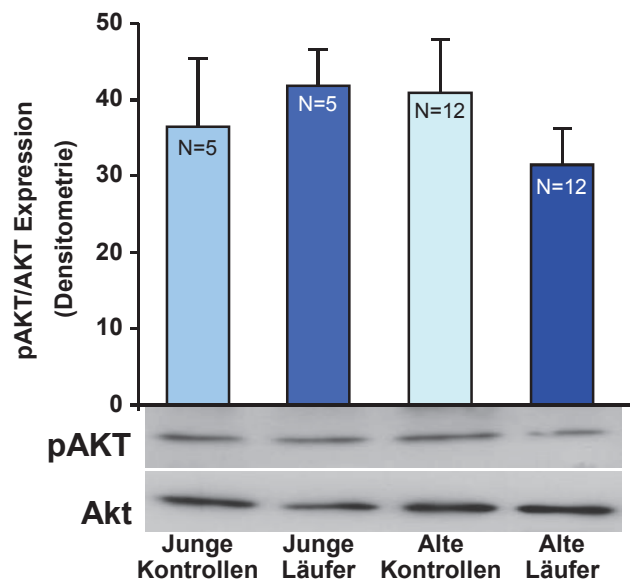
**B**



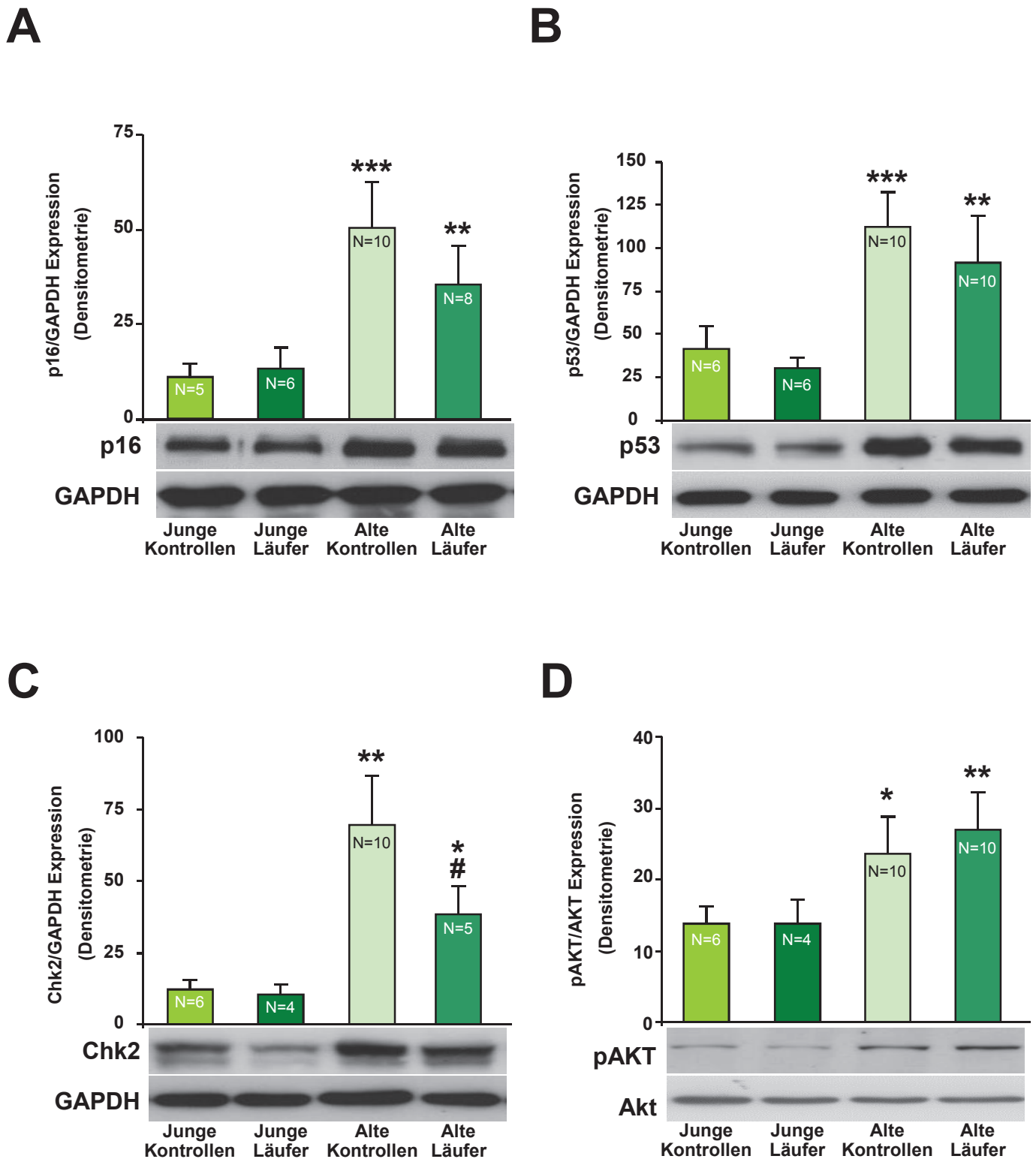
**C**



**D**



**Abbildung 13:** Einfluss eines dreiwöchigen freiwilligen Laufradtrainings in jungen und alten Mäusen auf die aortale Expression von Seneszenzproteinen und Zellzyklusregulatoren. Gezeigt sind (A) das Seneszenzmarkerprotein p16, (B) der Zellzyklusregulator und Apoptoseinduktor p53, (C) der DNA-Schadensindikator Chk2 und (D) das anti-apoptotische Protein phospho-AKT, bezogen auf Gesamt-AKT. Western Blots, normalisiert auf das Housekeeping-Protein GAPDH. \* $p < 0.05$  vs. junge Kontrollen.



**Abbildung 14:** Einfluss eines dreiwöchigen freiwilligen Laufradtrainings in jungen und alten Mäusen auf die hepatische Expression von Seneszenzproteinen und Zellzyklusregulatoren. Gezeigt sind (A) das Seneszenzmarkerprotein p16, (B) der Zellzyklusregulator und Apoptoseinduktor p53, (C) der DNA-Schadensindikator Chk2 und (D) das anti-apoptotische Protein phospho-AKT, bezogen auf Gesamt-Akt. Western Blots, normalisiert auf das Housekeeping-Protein GAPDH. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. junge Kontrollen, # $p < 0.05$  vs. alte Kontrollen.



**Abb. 13B+C).** In der Leber wurde keine Regulation von p53 und Chk2 in jungen und alten Tieren durch das Lauftraining beobachtet, jedoch waren die basalen Aktivitäten von p53 und Chk2 in alten Mäusen erhöht (Leber p53: junge Kontrollen  $41 \pm 14$ , junge Läufer  $30 \pm 6$ , alte Kontrollen  $112 \pm 20$ , alte Läufer  $91 \pm 27$ ; Leber Chk2: junge Kontrollen  $12 \pm 3$ , junge Läufer  $10 \pm 6$ , alte Kontrollen  $70 \pm 17$ , alte Läufer  $38 \pm 10$ ) (**Abb. 14B+C**).

Das anti-apoptotische Protein phospho-AKT (pAKT) wurde nur im Herzen bei jungen Tieren durch Training tendentiell hochreguliert, bei den alten Tieren war pAKT basal höher als bei den jungen, wurde jedoch durch das Lauftraining nicht signifikant gesteigert (junge Kontrollen  $7 \pm 2$ , junge Läufer  $11 \pm 3$ , alte Kontrollen  $18 \pm 3$ , alte Läufer  $22 \pm 2$ ) (**Abb. 12D**). In der Aorta und Leber ergab sich keine Änderung der pAKT-Proteinexpression durch ein dreiwöchiges Training, jedoch war in der Leber die pAKT-Expression bei den alten Tieren basal höher als bei den jungen (Aorta: junge Kontrollen  $36 \pm 9$ , junge Läufer  $42 \pm 5$ , alte Kontrollen  $41 \pm 7$ , alte Läufer  $32 \pm 5$ ; Leber: junge Kontrollen  $14 \pm 2$ , junge Läufer  $14 \pm 3$ , alte Kontrollen  $24 \pm 5$ , alte Läufer  $27 \pm 5$ ) (**Abb. 13D, 14D**).

## **4.2 Akute Regulation der MNC-Telomeraseaktivität und telomer-assoziiierter Faktoren durch körperliche Aktivität**

### **4.2.1 Charakteristika der „Waldläufer“**

Um die Frage einer akuten Telomeraseregulation durch körperliche Aktivität nachzugehen, absolvierten zehn junge und gesunde Medizinstudenten und Mitarbeiter der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, ohne regelmäßiges Ausdauertraining einen 5,6 km langen Waldlauf (**Tabelle 2**). Vor dem Lauf wurde ein Ruhe-EKG geschrieben, welches bei allen Probanden unauffällig war. Zusätzlich durchliefen alle Studienteilnehmer zur Überprüfung der körperlichen Leistungsfähigkeit eine Fahrradergometrie am Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes, die zeigte, dass die Probanden eine alters- und geschlechtsgemäß normale körperliche Belastbarkeit von im Mittel 3,8 Watt/kg hatten.

Peripheres Blut wurde den Teilnehmern zu fünf verschiedenen Zeitpunkten (vorher, 0, 6, 12, 24h) entnommen und die mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Zellzählung ergab im Vergleich zu den Ruhebedingungen nach der körperlichen Belastung eine Erhöhung der MNC-Zahl im peripheren Blut auf  $193 \pm 18\%$  mit einem Maximum nach 6 h (**Abb. 15**).

## Studiendaten

### Allgemeine Charakteristika:

n	<b>10</b>	
Geschlecht (männlich / weiblich)	<b>9 / 1</b>	
Alter (Jahre)	<b>27</b>	$\pm 1,7$

### Klinische Parameter:

Größe (cm)	<b>176</b>	$\pm 2,2$
Gewicht (kg)	<b>76</b>	$\pm 3,6$
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<b>21</b>	$\pm 3,7$
Sys. Blutdruck (mmHg)	<b>123</b>	$\pm 1,7$
Dias. Blutdruck (mmHg)	<b>78</b>	$\pm 1,8$
Herzfrequenz (min <sup>-1</sup> )	<b>58</b>	$\pm 4,0$

### Stresstest:

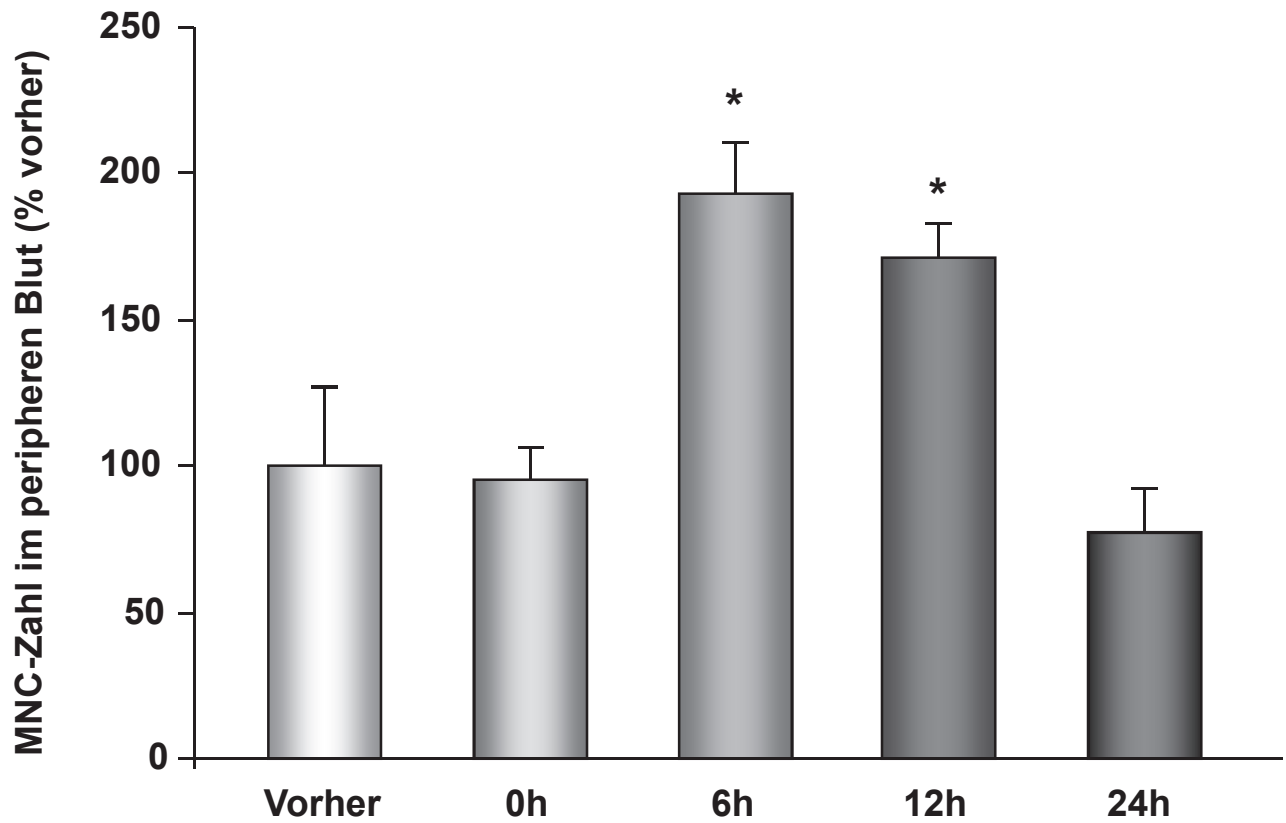
Maximale Belastbarkeit (Watt)	<b>294</b>	$\pm 16$
Relative maximale Belastbarkeit (Watt/kg)	<b>3,8</b>	$\pm 0,2$
Maximale Herzfrequenz (min <sup>-1</sup> )	<b>187</b>	$\pm 4,4$

### Laufprotokoll:

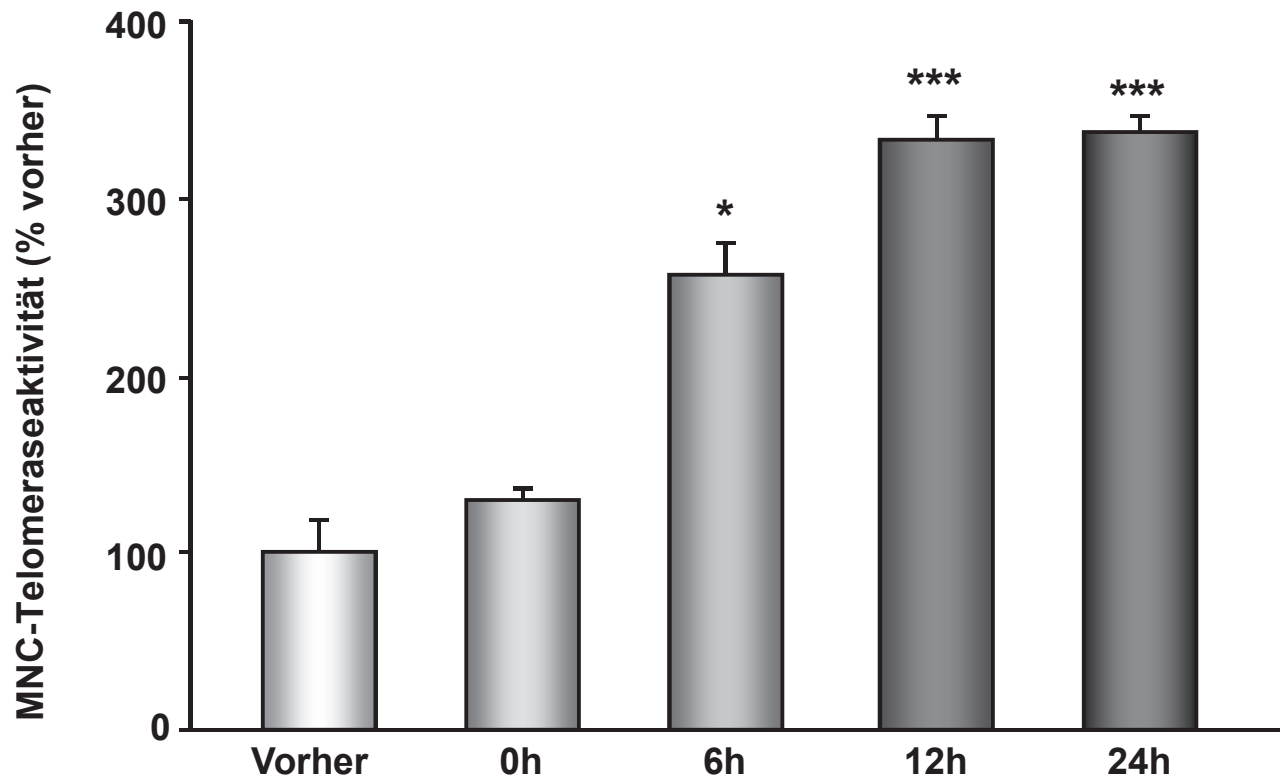
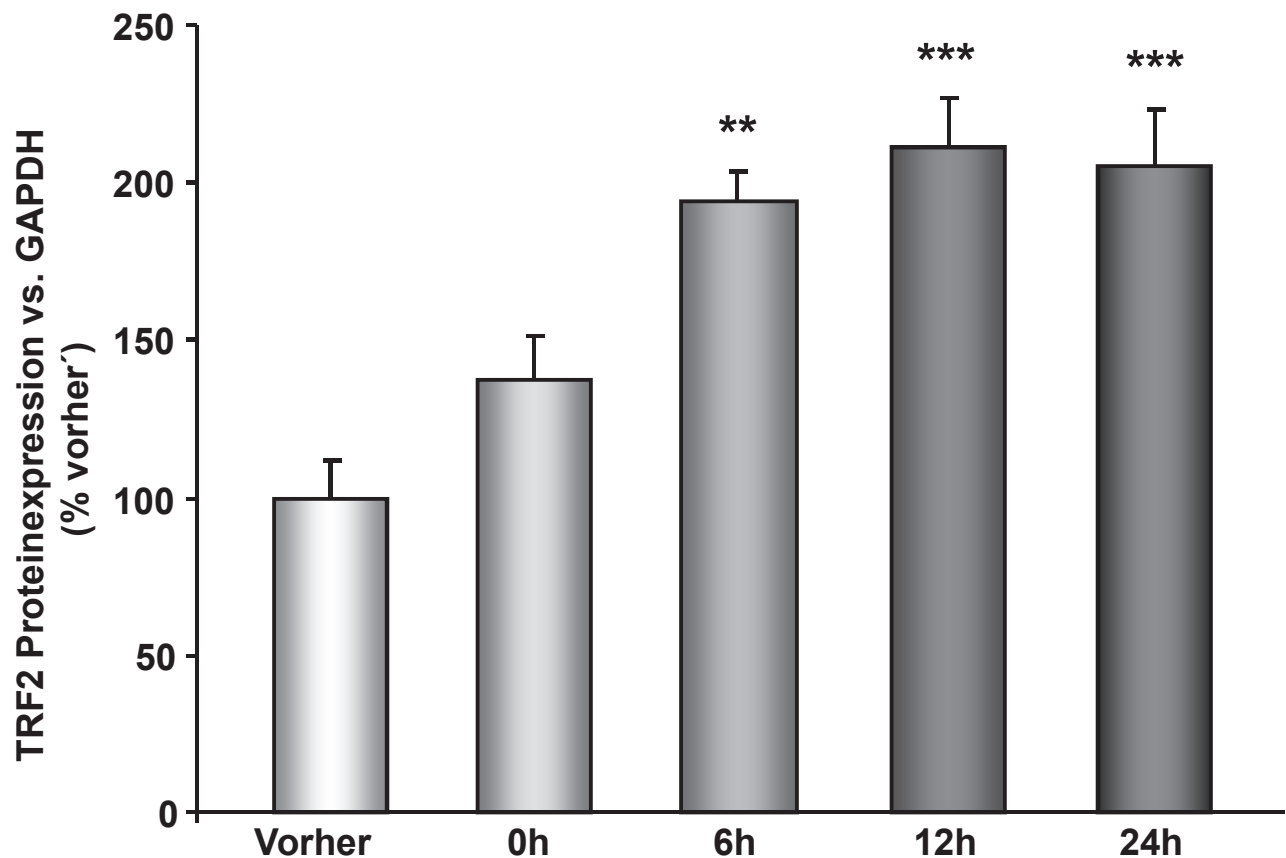
Gelaufene Strecke (km)	<b>5,6</b>
Dauer des Laufes (Minuten)	<b>45</b>
Durchschnittsgeschwindigkeit (km/h)	<b>7,4</b>

**Tabelle 2:** Basischarakteristika der 10 Teilnehmer des Pilotversuchs, die den Waldlauf durchgeführt haben. Gezeigt sind klinische Parameter, Ergebnisse der Ergometrie und das Laufprotokoll. Numerisch skalierte Daten sind gezeigt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM). BMI = Body Mass Index.

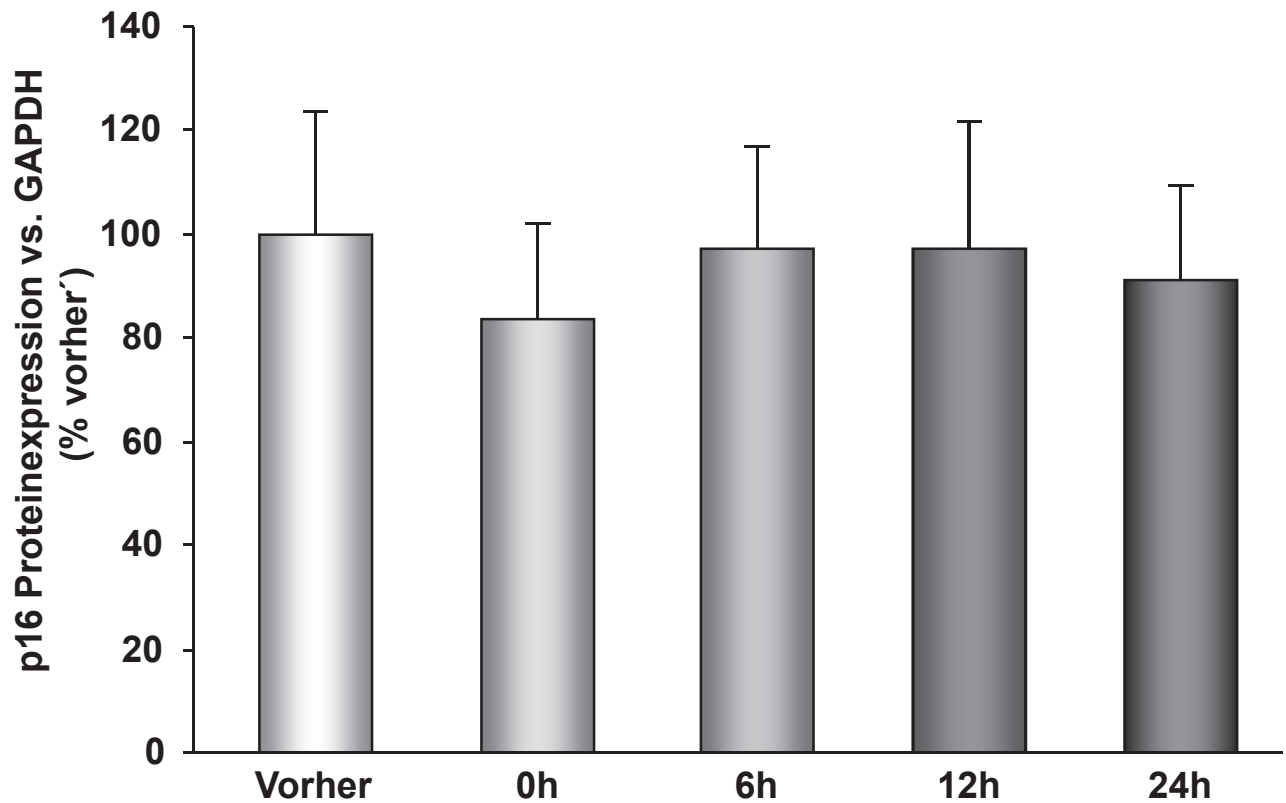
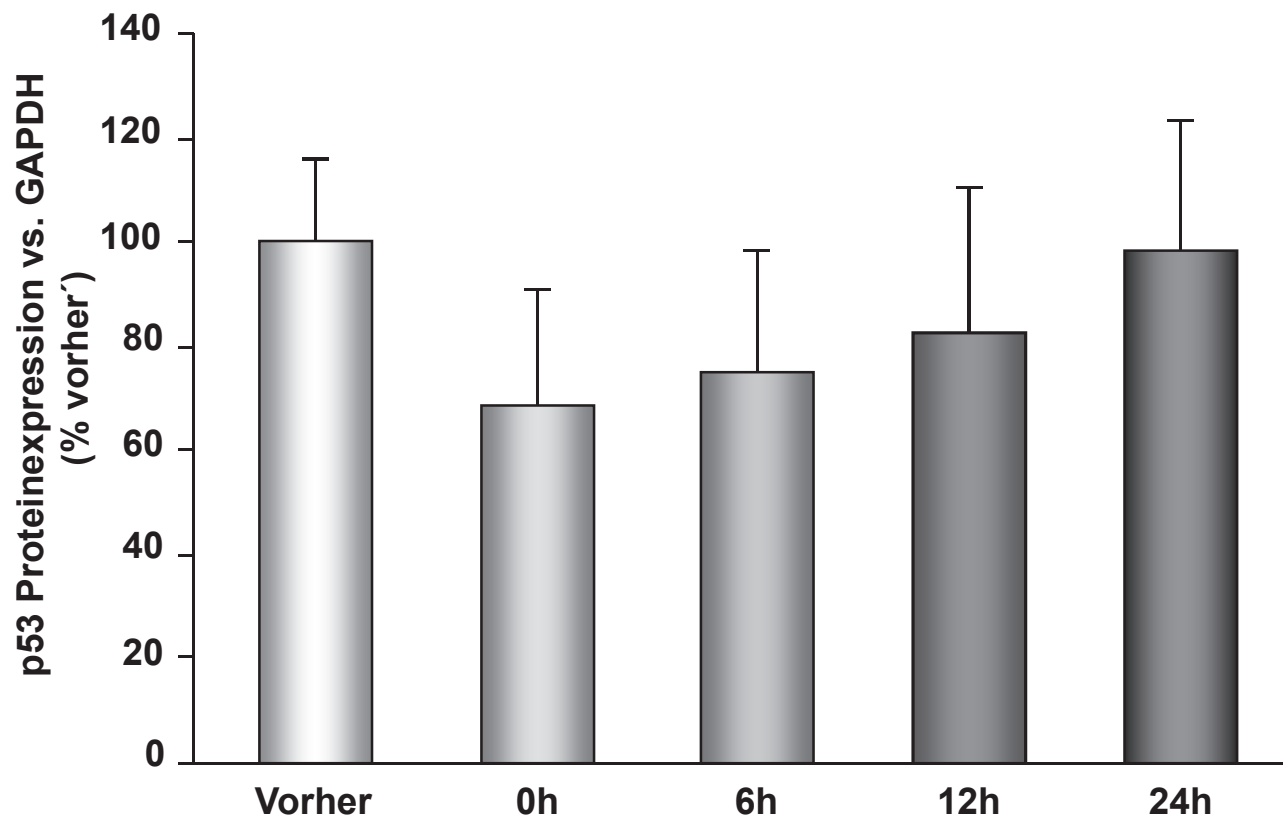
**Abbildung 15**



**Abbildung 15:** Akute Veränderung der Zahl mononukleärer Zellen (MNC) im peripheren Blut vor und bis 24 Stunden nach einem Waldlauf in 10 jungen, gesunden Probanden. \* $p < 0.05$  vs. vorher.

**A****B**

**Abbildung 16:** Regulation der MNC-Telomeraseaktivität (TRAP-Assay) (**A**) und der TRF2-Proteinexpression (**B**) in mononukleären Zellen (MNC) im peripheren Blut vor und bis 24 Stunden nach einem Waldlauf in 10 jungen, gesunden Probanden. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. vorher.

**A****B**

**Abbildung 17:** Zeitlicher Verlauf der Proteinexpression (**A**) des Seneszenzmarkers p16 und (**B**) des Zellzyklusinhibitors p53 in mononukleären Zellen (MNC) im peripheren Blut in 10 jungen, gesunden Probanden vor und bis 24 Stunden nach einem Waldlauf.

#### **4.2.2 Akute Regulation von Telomerase, Telomer-regulierender Faktoren und Zellzyklusregulatoren**

Die Bestimmung der Telomeraseaktivität erfolgte mit Hilfe des Telomere Repeat Amplification Protokolls (TRAP-Assay) in jeweils 10.000 MNC und zeigte einen bereits während des Laufs beginnenden, glockenförmigen Anstieg der Telomeraseaktivität nach dem Training (0h  $129 \pm 6\%$ ; 6h  $257 \pm 18\%$ ; 12h  $333 \pm 14\%$ ; 24h  $336 \pm 11\%$ , jeweils vs. Ruhebedingung; Statistik: 6h  $p < 0.05$  u. 12h, 24h  $p < 0.001$  vs. Ruhe) (**Abb. 16A**). Western Blot Analysen der Proteinexpression des Telomere Repeat-Binding Factor (TRF) 2, einem Telomer-stabilisierenden Protein, ergaben einen graduellen Anstieg nach der Belastung (0h  $137 \pm 14\%$ ; 6h  $194 \pm 10\%$ ; 12h  $212 \pm 15\%$ ; 24h  $205 \pm 18\%$ , jeweils vs. Ausgangswert vor dem Waldlauf; Statistik: 12h  $p < 0.01$  u. 24h  $p < 0.05$  vs. Ruhe) (**Abb. 16B**). Die MNC-Proteinexpression der Zellzyklusregulatoren p16 und p53 war nach dem Waldlauf nicht akut verändert (**Abb. 17A+B**).

Diese Pilotstudie zeigt, dass ein einziger Waldlauf bei submaximaler Geschwindigkeit eine schnelle Heraufregulation der Telomeraseaktivität und des Telomer-Repeat Binding Factor 2 in zirkulierenden Blutzellen bei jungen, gesunden Personen ohne relevanten Trainingshintergrund bewirkt.

#### **4.3 Prospektive Pilotstudie zur Messung des Einflusses eines dreimonatigen Intervalltrainings auf Telomeraseaktivität und telomer-assoziierte Faktoren**

##### **4.3.1 Charakteristika der Trainingsstudienteilnehmer**

Der Einschluss der Teilnehmer an einer prospektiven Trainingsstudie erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Bei den Probanden handelte es sich um 10 gesunde Personen mittleren Alters ohne regelmäßiges Ausdauertraining (**Tabelle 3**).

Nach einem Eingangstest (EKG, Laufband-Spiroergometrie zur Ermittlung der maximalen Herzfrequenz) durchliefen die Probanden ein über 3 Monate hochintensives, pulskontrolliertes Lauftraining nach der 4x4-Intervallmethode. Das Training bestand aus 3 Einheiten pro Woche. Nach jeweils 5 Minuten Aufwärmen (65%-75% HFmax) wurden vier Intervalle (80%-90% HFmax) von jeweils 4 Minuten Dauer, getrennt durch 3 Minuten langsames Laufen (65%-75% HFmax), sowie ein abschließendes Auslaufen bei 65%-75% HFmax für 3 Minuten durchgeführt. Nach 3 Monaten wurde die

## Studiendaten

Allgemeine Charakteristika:

n	10	
Geschlecht (männlich / weiblich)	2 / 8	
Alter (Jahre)	44	± 2,6

	Baseline	3 Monate
<b>BMI</b>	24 ± 3 kg/m <sup>2</sup>	24 ± 3 kg/m <sup>2</sup>
<b>Ruhepuls</b>	80 ± 15 /min	76 ± 11 /min
<b>RR systolisch</b>	117 ± 7 mmHg	117 ± 8 mmHg
<b>RR diastolisch</b>	75 ± 6 mmHg	73 ± 6 mmHg
<b>VO<sub>2max</sub></b>	37.5 ± 7 ml/min*kg	37.4 ± 8 ml/min*kg
<b>Vmax</b>	10.6 ± 1.5 km/h	11.8 ± 2.2 km/h
<b>PWC150</b>	6.6 ± 1.4 km/h	7.4 ± 1.6 km/h

**Tabelle 3:** Basischarakteristika der 10 untrainierten Probanden mittleren Alters vor dem Beginn des dreimonatigen Intervalltrainings. Effekte des Trainings auf den Body Mass Index (BMI), Puls, Blutdruck und die körperliche Leistungsfähigkeit (Laufbandergometrie). Numerisch skalierte Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardfehler (SEM). VO<sub>2max</sub>: maximale Sauerstoffaufnahme; Vmax: maximale Laufgeschwindigkeit; PWC150: Laufgeschwindigkeit bei einem Puls von 150/min.

ergometrische Leistungsfähigkeit erneut evaluiert. Hier sah man, dass es zu einer leichten Abnahme des Ruhepulses (Start:  $80 \pm 15$ /min, 3 Monate:  $76 \pm 11$ /min) und des diastolischen Blutdruckes (Start:  $75 \pm 6$  mmHg, 3 Monate:  $73 \pm 6$  mmHg) kam. In Bezug auf die körperliche Fitness kam es zu keiner Veränderung der maximalen Sauerstoffaufnahme ( $VO_{2max}$ ) der Probanden (Start:  $37,5 \pm 7$  ml/min\*kg, 3 Monate:  $37,4 \pm 8$  ml/min\*kg), aber zu einer signifikanten Steigerung der maximalen Laufgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) auf dem Laufband (Start:  $10,6 \pm 1,5$  km/h, 3 Monate:  $11,8 \pm 2,2$  km/h) und der Laufgeschwindigkeit bei einem Puls von 150/min (Physical Working Capacity, PWC150) (Start:  $6,6 \pm 1,4$  km/h, 3 Monate:  $7,4 \pm 1,6$  km/h).

Im Verlauf der 3 Monate schieden 2 der initial 10 Probanden aus der Studie aus, ein Proband verletzungsbedingt und ein Proband aus persönlichen Gründen, so dass am Ende nur 8 Probanden in die Analyse eingingen.

#### **4.3.2 Effekte von Intervalltraining auf Telomerase und Seneszenzmarker in zirkulierenden Zellen**

Jeweils vor und nach der ersten und letzten Trainingseinheit wurden mononukleäre Zellen (MNC) durch Dichtegradientenzentrifugation aus dem peripheren Blut isoliert. Die Bestimmung der Telomeraseaktivität erfolgte wiederum mit Hilfe von Telomere Repeat Amplification Protocols (TRAP-Assays) in jeweils 10.000 MNC. Die Messung direkt vor und nach dem Training zeigte keinen Effekt auf die Telomeraseaktivität (**Abb. 18A**). Nach 3 Monaten Training zeigte sich ein Anstieg der Telomeraseaktivität auf  $145 \pm 7\%$  im Vergleich zum Eingangstest (**Abb. 18B**).

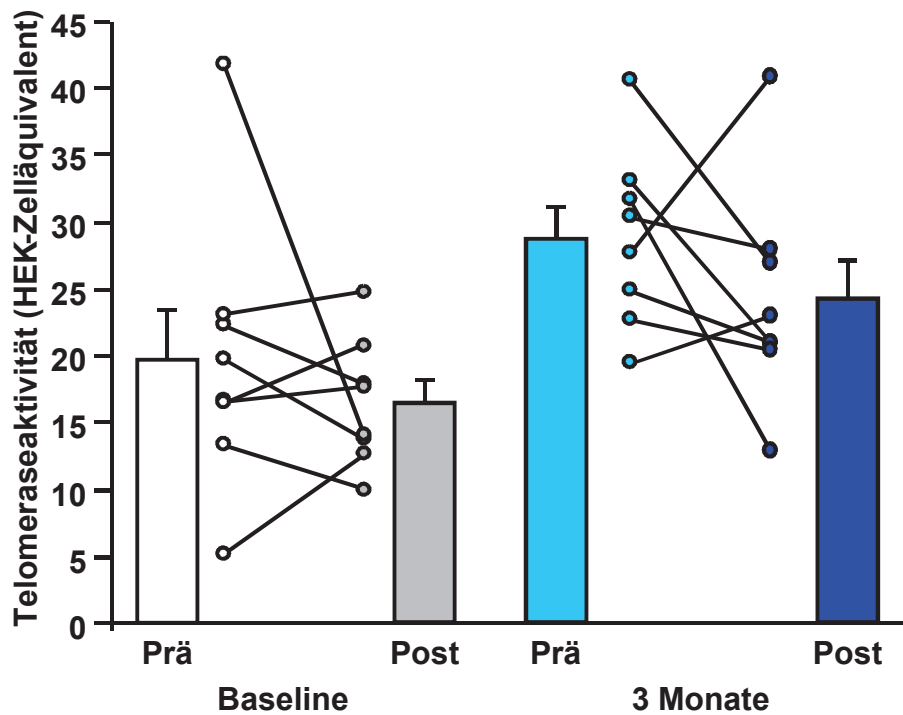
Ferner zeigte sich ein Trend zu einer erhöhten mRNA-Expression des telomerstabilisierenden Faktors TRF2 ( $210 \pm 28\%$  vs. Eingangstest,  $p=0.14$ ) (**Abb. 19B**), während die Proteinexpression von TRF2 annähernd konstant blieb (**Abb. 19A**).

Hinsichtlich der Proteinexpression des Seneszenzmarkers p16 gab es einen Trend zur Herabregulation durch das Intervalltraining ( $75 \pm 15\%$  vs. Eingangstest,  $p=0.07$ ) (**Abb. 20A**). Die monozytäre Proteinexpression des Apoptoseregulators und Seneszenzmarkers p53 war nach der Trainingsperiode signifikant vermindert ( $68 \pm 23\%$  vs. Eingangstest,  $p<0.01$ ) (**Abb. 20B**).

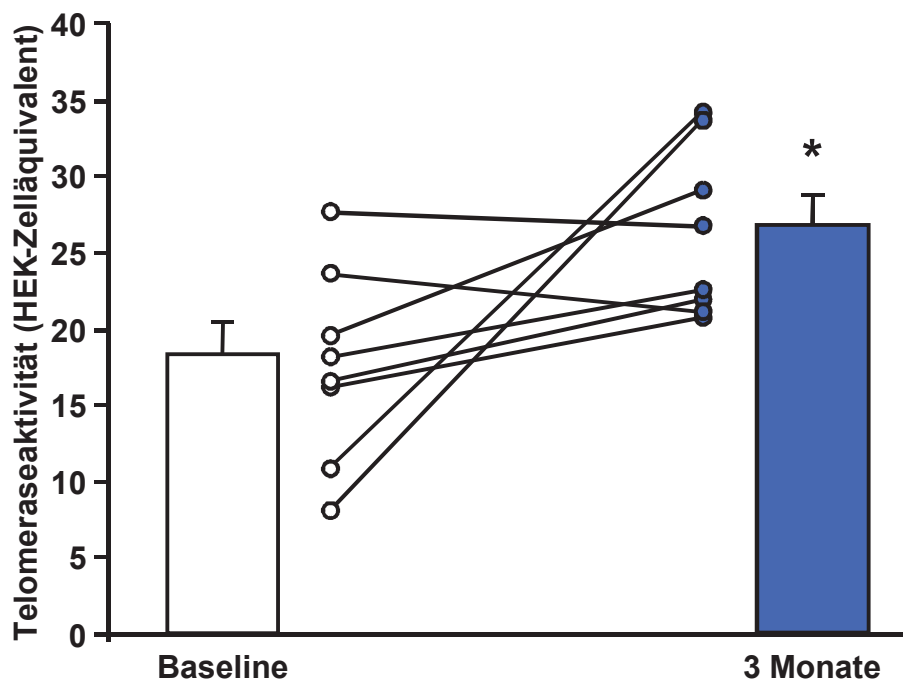
Der Einfluss des Intervalltrainings auf die MNC-Telomeraseaktivität und die Expression telomerassoziierter Proteine und Zellzyklusregulatoren war mit einer signifikanten Verbesserung der maximalen laufbandergometrischen Laufgeschwindigkeit (von



A

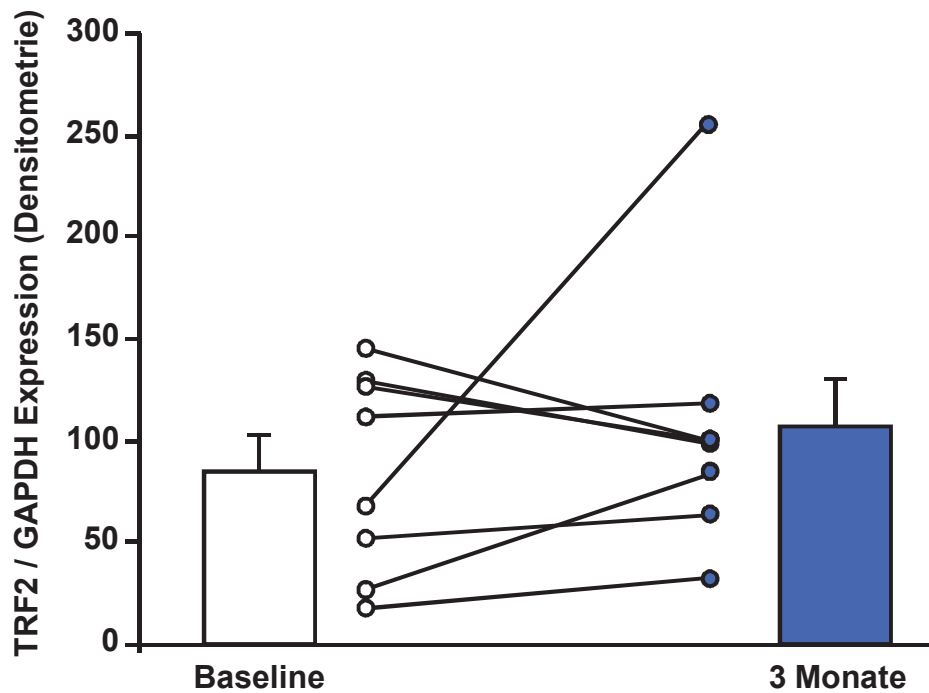


B

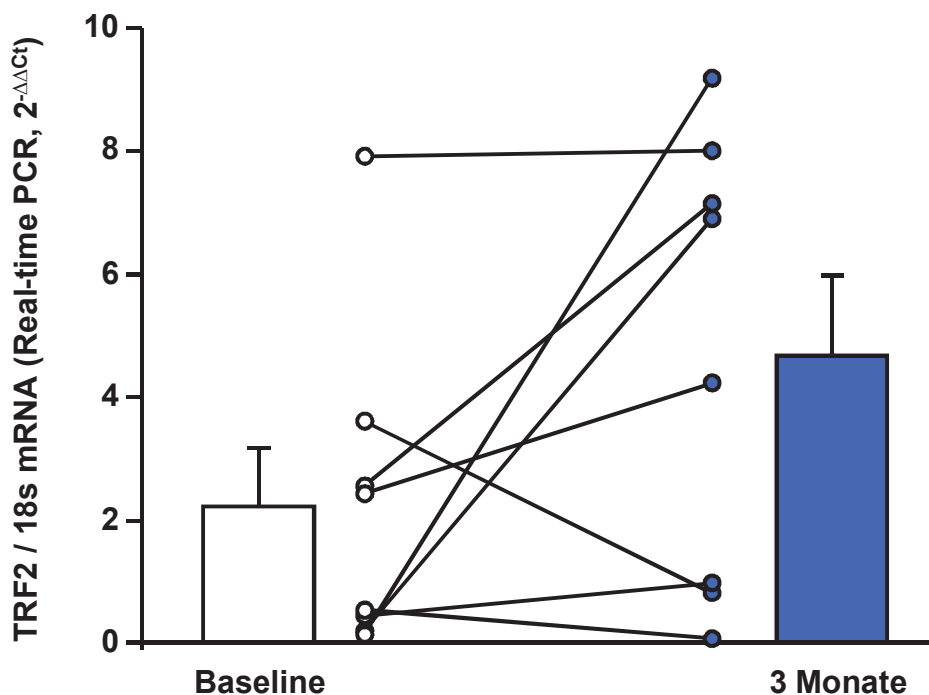


**Abbildung 18:** Telomeraseaktivität in mononukleären Zellen (MNC) des peripheren Bluts im Vergleich zu HEK294-Zellen vor und nach einem dreimonatigen Intervalltraining, gemessen mittels TRAP-Assay. **(A)** MNC-Telomeraseaktivität direkt vor und nach dem ersten (Baseline) und letzten Training (3 Monate); **(B)** Gemittelte Telomeraseaktivität vor und nach der Trainingsphase. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Gruppe und individueller Verlauf. N=8. \*p<0.05 vs. Baseline.

**A**

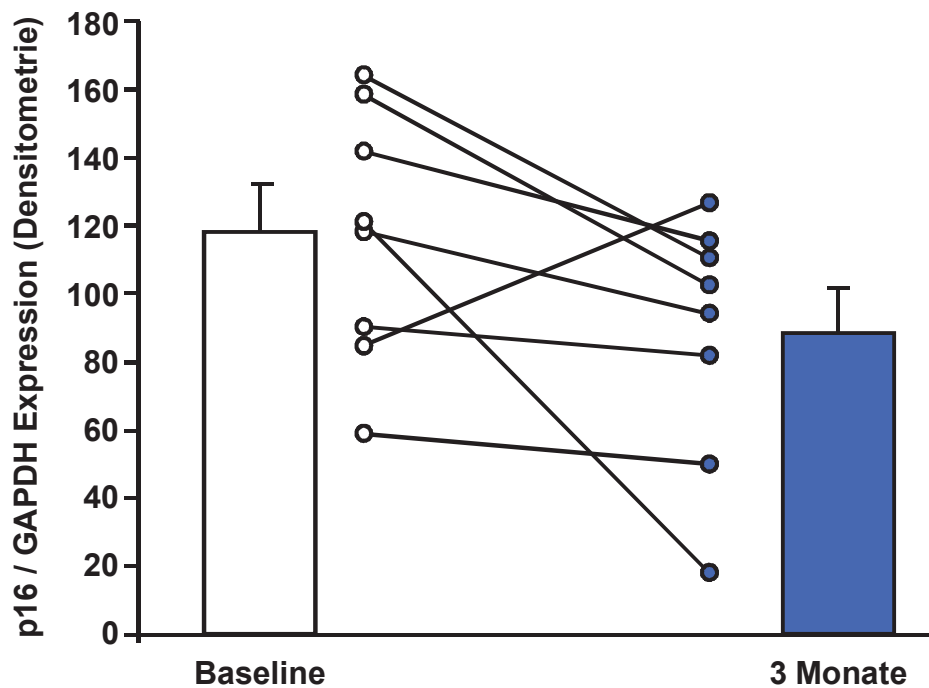


**B**

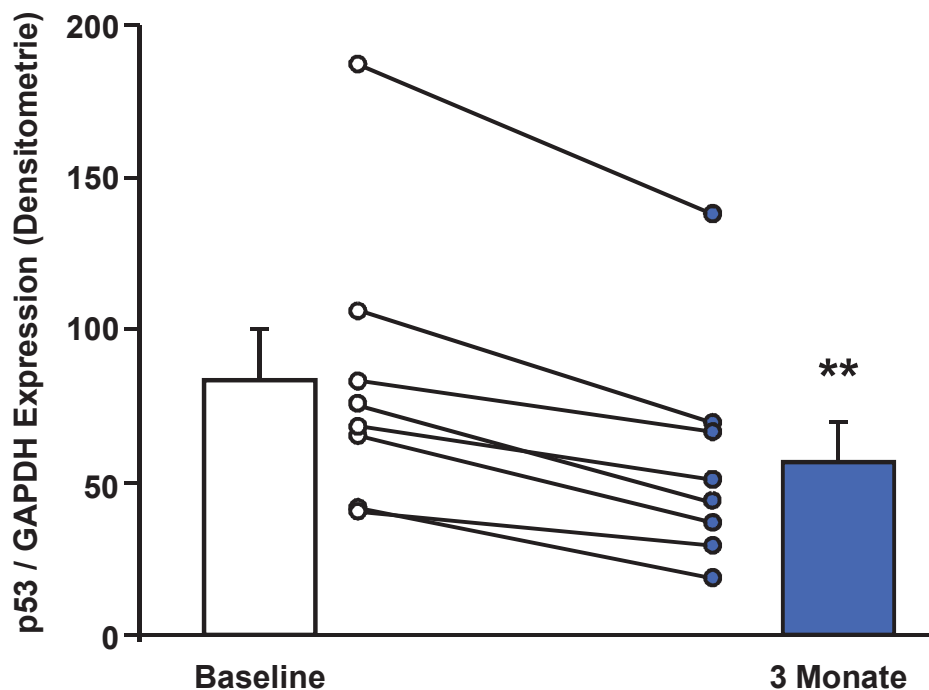


**Abbildung 19:** Einfluss eines pulskontrollierten Intervalltrainings über drei Monate auf (A) die Proteinexpression des Telomer Repeat-Binding Factor 2 (Western Blots, bezogen auf GAPDH als Housekeeping-Protein) und (B) die TRF2-Genexpression (Real-time PCR, bezogen auf 18s als Housekeeping-Gen) in den mononukleären Zellen von initial untrainierten Probanden, gezeigt als Mittelwert und Standardfehler der Gruppe und als individueller Verlauf. N=8.

**A**



**B**



**Abbildung 20:** Regulation der Proteinexpression (Western Blots, bezogen auf das Housekeeping Protein GAPDH) des Seneszenzmarkerproteins (**A**) und des Apoptoseregulators p53 (**B**) in den mononukleären Zellen vor und nach einem dreimonatigen Intervalltraining, gezeigt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Gruppe bzw. individueller Verlauf. N=8. \*\*p<0.01 vs. Baseline.

10,6±1,5 km/h auf 11,8±2,2 km/h;  $p=0.03$ ; **Tabelle 3**) sowie einer Erhöhung der ausbelastungsunabhängigen PWC150 (von 6,6±1,4 km/h auf 7,4±1,6 km/h;  $p=0.02$ ; **Tabelle 3**) assoziiert.

Diese mechanistisch angelegte Pilotstudie zeigt, dass ein dreimonatiges, hochintensives Intervall-Ausdauertraining zu einer Heraufregulation der Telomeraseaktivität und verminderten Expression von Seneszenzmarkern in zirkulierenden Blutzellen von Personen ohne relevanten Trainingshintergrund führt.

## 5 Diskussion

Bis heute ist nur unzureichend verstanden, wie körperliche Aktivität auf molekularer Ebene zu positiven kardiovaskulären Effekten führt. Die vorliegende Promotionsarbeit hat die molekularen Mechanismen von Lauftraining im Hinblick auf die Effekte auf Telomerase, telomer-assoziierte Faktoren und Seneszenzmarker in Mäusen und im Menschen untersucht.

Die Fragestellung ergab sich aus Vorstudien, die gezeigt haben, dass Laufradtraining in Mäusen zu einer Aktivitätssteigerung der myokardialen und vaskulären Telomerase und einer gesteigerten Expression telomer-assoziiierter Proteine sowie verminderten Expression von Markern der Zellalterung führte. Auf der funktionellen Ebene waren die trainierten Tiere im Schadensmodell vor einer toxischen Kardiomyozyten- und Endothelzellapoptose geschützt. Bei Übertragung der tierexperimentellen Befunde auf den Menschen zeigte sich, dass sowohl bei jungen als auch bei Ausdauersportlern mittleren Alters die Telomeraseaktivität und die TRF2-Expression in zirkulierenden mononukleären Zellen (MNC) heraufreguliert und Seneszenzmarker im Vergleich zu den Kontrollen herabreguliert waren. Als Hauptbefund war die in einer passenden Kontrollgruppe unsportlicher Probanden mittleren Alters messbare Verkürzung der Telomerlänge in den Masterathleten deutlich reduziert. Dies spricht für einen „Anti-Aging“ Effekt von Ausdauertraining auf molekularer Ebene. Andere Arbeitsgruppen haben in kleineren Studien ebenfalls positive Zusammenhänge zwischen körperlicher Aktivität und Telomerlänge aufgedeckt (Ludlow et al., 2008; Ornish et al., 2008).

Die hier durchgeführten Experimente in jungen und alten Mäusen mit und ohne freiwilliges Laufradtraining zeigten eine deutliche trainings- und altersabhängige Regulation: Bei den jungen Mäusen führte das Training zu einer Erhöhung der kardialen und aortalen, aber nicht der hepatischen Telomeraseaktivität und TRF2-Expression. Parallel dazu kam es zu einer Abnahme der Seneszenzmarkerexpression im Myokard und in der Aorta, aber nicht in der Leber. Bei den alten Mäusen waren die Telomeraseaktivität und TRF2-Expression im Vergleich zu den jungen Mäusen schon basal erhöht und das Lauftraining hatte keinen signifikanten zusätzlichen Effekt auf diese Parameter. Parallel war die Expression von Seneszenzmarkern erhöht und diese wurden durch das Training in den alten Mäusen signifikant vermindert.

Im zweiten Teil des Projekts wurde in einem Akutversuch an 10 jungen, gesunden Probanden, die einen Waldlauf durchführten, erstmals eine akute Regulation der Telomeraseaktivität und telomer-assoziiierter Proteine im Menschen nachgewiesen.

Weiterhin fand sich in einer Pilotstudie an 8 untrainierten Personen, dass ein dreimonatiges Intervalltraining ebenfalls zu einer Beeinflussung der Telomerase, telomer-assoziiierter Faktoren und Seneszenzmarker führte.

Obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit deskriptiver Natur sind, d.h. den Mechanismus, wie Lauftraining im Menschen und in der Maus zu diesen günstigen Effekten auf den Telomerkomplex führt, nicht weiter entschlüsseln können, haben sie zu neuen Erkenntnissen über die Organspezifität und die Kinetik der Beeinflussung von die Zellalterung beeinflussenden Faktoren geführt.

### **5.1 Effekte eines dreiwöchigen Laufradtrainings auf die Zellalterung in jungen und alten Mäusen**

Die Telomerase und telomer-assoziierte Proteine spielen eine bedeutende Rolle in der Zellalterung. Es wurde gezeigt, dass eine verminderte Telomeraseaktivität zu einer Verkürzung der Telomere und somit zu einer Abnahme der Lebensspanne führt (Blasco, 2005). Die Abnahme der Telomerlänge ist neben anderen Mechanismen ein wesentlicher Regulator der Zell- und Organalterung und wahrscheinlich ein bedeutsamer Pathogenesefaktor für altersabhängige Krankheiten (Boccardi & Paolisso, 2014). Im Alter kommt es zu multiplen funktionellen und morphologischen Veränderungen auf Organ- und Zellebene. Cherif et al. bestätigten, dass es im Alter in unterschiedlichen differenzierten Geweben wie der Niere, des Pankreas, der Leber und der Lunge von männlichen und weiblichen Ratten zu einer Abnahme der Telomerlänge kommt (Cherif et al., 2012). Als Beispiel funktioneller Veränderungen zeigten Rammos et al., dass sich bei alten im Vergleich zu jungen Mäusen im Alter in der Aorta eine vaskuläre Dysfunktion durch eine zunehmende Steifigkeit der Gefäßwand und eine damit verbundene Blutdruckerhöhung findet (Ramos et al., 2014). Passend zu den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten Ludlow et al., dass in Mäusen körperliche Aktivität die altersbedingte Abnahme der Telomerlänge in Herz und Leber verringert (Ludlow et al., 2012).

Während die früheren Arbeiten bereits veranschaulichten, dass sich ein Laufradtraining positiv auf Telomeraseaktivität und telomer-assoziierte Faktoren auswirkt, befasst sich diese Promotionsarbeit mit den Effekten eines Laufradtrainings auf die Regulatoren der Zell- und Organalterung im direkten Vergleich von jungen mit alten Mäusen, was bis heute noch nicht untersucht wurde.

Bei den jungen C57Bl/6-Mäusen führte ein freiwilliges dreiwöchiges Laufradtraining zu einer Hochregulation der Telomeraseaktivität in Herz, Aorta und zirkulierenden Zellen, gemessen mit Hilfe des etablierten Telomerase Repeat Amplification Protocols (TRAP-Assay). Dies bestätigt die Vorbefunde der Arbeitsgruppe. Neu ist der Befund, dass sich bereits basal in der Leber eine hohe Telomeraseaktivität fand, die durch Training nicht weiter steigerbar war. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass in der Leber im Vgl. zu Herz und Gefäßwand mehr Zellen mit hoher Teilungsrate sind, was die Regenerationsfähigkeit dieses Organs bis ins Alter erklärt.

Bei den alten C57Bl/6-Mäusen führte das Laufradtraining zu einer Steigerung der aortalen Telomeraseaktivität, hatte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die myokardiale und hepatische Telomeraseaktivität. In Herz und Aorta hatten die sitzenden alten Mäuse im Vergleich zu den jungen Mäusen eine erhöhte basale Telomeraseaktivität. In MNCs wurde die Telomerase sowohl bei den jungen als auch bei den alten Tieren durch ein dreiwöchiges Laufradtraining heraufreguliert. Diese Befunde sind hier erstmals gezeigt worden und sprechen für eine organspezifische Regulierbarkeit der Telomerase, die sich insbesondere auf Zellen in der Gefäßwand und zirkulierende Zellen zu erstrecken scheint, was für die mechanistische Bedeutung des Scherstress und Regulatoren desselben, z.B. NO, spricht. Trinity et al. zeigten, dass der altersbedingt erniedrigte Scherstress in arteriellen Gefäßen des Beines im Wesentlichen durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO im Alter erklärt werden kann (Trinity et al., 2014). McCarty zeigte, dass mit zunehmendem Alter die Kapazität des Endothels NO zu produzieren durch Abnahme der endothelialen NO Synthase (eNOS) nachlässt, was das alters-bedingte vaskuläre Risiko erhöht. Durch Interventionen, die diesem Verlust der NO-Bioverfügbarkeit entgegenwirken, kann daher wahrscheinlich der endotheliale Alterungsprozess verlangsamt werden (McCarty, 2004).

Ebenfalls neu ist der Befund, dass alte im Vergleich zu jungen Tieren mehr Telomerase haben. Dies muss weiter mechanistisch abgeklärt werden, es könnte einen Kompensationsmechanismus darstellen, der der Telomerverkürzung entgegenwirken

solle. Es könnte aber auch dafür sprechen, dass im alten Organ mehr Zellen mit hoher Telomeraseaktivität sind, z.B. Fibroblasten (Altersherz – Myokardfibrose).

Analysen der Proteinexpression zeigten bei den jungen Mäusen eine Heraufregulation des Telomere Repeat-Binding Factor 2 (TRF2) in Herz und Aorta durch Lauftraining, was die Vorbefunde bestätigt. Bei den alten Tieren fand sich interessanterweise bereits basal eine höhere TRF2-Expression in Herz, Aorta und Leber, die jedoch durch das Laufradtraining nicht weiter gesteigert wurde. Dieser neue Befund könnte ein Indiz dafür sein, dass es im Alter einen Kompensationsmechanismus gibt mit dem Ziel, die telomerischen T-Loops im Rahmen der altersbedingten Telomerverkürzung besser zu stabilisieren. Es könnte aber, passend zu den Vorarbeiten, auch so sein, dass TRF2, wie auch für die Telomerase selbst bekannt, nicht nur die bekannte „kanonische“ Funktion bei der T-Loop-Stabilisierung hat, sondern weitere Funktionen im zellulären Signalnetzwerk innehat, die mit der Anpassung der Zellen und Organe an veränderte Bedingungen zusammenhängen. Es wird daher spannend sein, herausfinden, wie TRF2 unter „Stress“, d.h. im Fall einer kardiovaskulären Schädigung wie einer Nachlast-induzierten Myokardhypertrophie durch Aortic Banding oder einer Myokardischämie, reguliert wird, d.h. ob TRF2 Teil eines Regelkreises in kardiovaskulären Geweben ist, der Prozesse wie Hypertrophie und Fibrose steuert.

Bei den jungen Tieren kam es wie in den Vorarbeiten durch körperliche Aktivität zu einer Herabregulation der Seneszenzmarkerproteine p16, p53 und Chk2 im Herzen und der Aorta, nicht aber in der Leber. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Effekte des Lauftrainings durch hämodynamische Reize („Scherstress“) vermittelt werden, dem das Leberparenchym bei Lauftraining im Gegensatz zu Herz und Gefäßwand nicht so direkt ausgesetzt ist. Andererseits könnten spezifische Faktoren durch das Laufen aktiviert werden, die in kardiovaskulären Zellen die Seneszenzmarkerexpression inhibieren. Gerade im Hinblick auf die Therapie altersabhängiger Herz-Kreislaufferkrankungen ist diese Hypothese sehr spannend.

Es wurde gezeigt, dass in den alten Tieren basal die Seneszenzmarkerproteine p16, p53 und Chk2 in Herz, Aorta und Leber im Vergleich zu den jungen Tieren erhöht waren. Dies weist darauf hin, dass in den Organen seneszente Zellen waren. Die Telomerlänge war im Herz und Aorta zwischen den Tieren nicht unterschiedlich, dies könnte aber methodisch bedingt sein. Die Real-Time-PCR zeigte, dass die Telomerlänge sowohl in jungen als auch in alten Tieren durch das dreiwöchige



Lauftraining akut nicht verändert wurde. Dies ist so erwartet, weil die Telomerlänge ein Parameter ist, der sich nur langsam (infolge repetitiver Zellteilung) ändert, so dass eine kurzfristige Intervention daran nichts ändert, wie in Vorarbeiten (Werner et al., 2008) schon gezeigt. Außerdem haben Mäuse viel längere Telomere als Menschen (Kipling & Cooke, 1990; Forsyth et al., 2002) und es ist entsprechend schwer, kleine Unterschiede herauszuarbeiten. Interessanterweise hatten die alten Tiere kurze Telomere in der Leber, was dafür spricht, dass sich die Zellen in diesem Organ schon oft geteilt haben, passend zum oben genannten Konzept der Regenerationsfähigkeit der Leber bis ins Alter.

Diese Arbeit zeigt auch erstmals, dass es bei einem dreiwöchigen Lauftraining bei den alten Tieren zu einer Herabregulation von Seneszenzmarkern im Herz und der Aorta kam, in der Leber wurde Chk2, ein Marker für DNA-Schäden, günstig beeinflusst. Dieser Befund würdigt ebenfalls eine weitere mechanistische Abklärung, z.B. in Telomerase-Knockout-Mäusen, um abzuklären, ob die Telomerase dafür verantwortlich ist oder ob andere Mediatoren dies steuern.

Einer dieser möglichen Faktoren ist das anti-apoptotische Protein phospho-AKT (pAKT), das „upstream“ quasi aller mit Überleben und Apoptose interagierenden Signaltransduktionswege steht. Im Myokard ist Akt ein wichtiges Signalprotein. Neben Akt spielt Pim-1 eine wichtige Rolle. Muraski et al. zeigten, dass Pim-1 ein entscheidender Faktor für das kardioprotektive „Downstream“-Signalling von Akt ist (Muraski et al., 2007). Während die Analysen von Akt in den Aorten der Tiere methodisch und aus Mangel an Material bedingt nicht aussagekräftig waren, sah man deutlich, dass pAKT in den alten Mäusen in Herz und Leber gesteigert war, es wurde jedoch durch das Lauftraining nicht weiter hochreguliert.

Insgesamt zeigen diese Experimente eine komplexe Regulation von Telomerase, telomer-assoziierten Proteinen und Seneszenzmarkern unter dem Einfluss von Lauftraining, die sowohl alters- als auch organabhängig ist. Die Effekte von Lauftraining fanden sich vor allem in den Organen und Zellen des Herz-Kreislaufsystems. Während die Effekte auf den Telomerkomplex vor allem in jungen Mäusen ausgeprägt waren, scheint es in alten Tieren eher Effekte auf die Seneszenzmarker zu geben. Ließen sich die Befunde auf den Menschen übertragen, stellten die Ergebnisse eine mögliche neue Erklärung der positiven Effekte von körperlicher Aktivität auf die altersabhängigen Herz-Kreislaufveränderungen dar.

## **5.2 Effekte von körperlicher Aktivität auf Telomerase und telomer-assoziierte Faktoren im Menschen**

Vergleiche der Telomerlänge zwischen verschiedenen Geweben zeigen, dass diese altersabhängig abnimmt (z.B. Butler et al., 1998). Obwohl eindeutige Beweise für die Kausalität fehlen, ist man auf Grund der Tatsache, dass zelluläre, organische und funktionelle Charakteristika des Alterungsphänotyps mit den Befunden bei kardiovaskulären Erkrankungen eine große Schnittmenge bilden, davon überzeugt, dass es einen engen Zusammenhang zwischen den Mechanismen zellulärer Seneszenz und der Pathogenese von Herz-Kreislauferkrankungen gibt (Fyhrquist et al., 2013). Dies ist von großer Bedeutung, da sich sowohl zelluläre Alterung als auch kardiovaskuläre Erkrankungen durch positive Lebensstilinterventionen wie körperliche Aktivität günstig beeinflussen lassen, während negative Einflüsse wie kardiovaskuläre Risikofaktoren das Gegenteil bewirken. Daher ist es potentiell im Hinblick auf den Einsatz von körperlicher Aktivität als Intervention in der Prävention enorm bedeutsam, die molekularen Mechanismen besser zu verstehen, um Training in der Therapie gezielter einsetzen zu können.

Inwieweit körperliche Aktivität Telomerase und telomer-assoziierte Faktoren im Menschen beeinflusst, ist bislang wenig erforscht, aber es gibt nach der genannten Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe (Werner et al., 2009) immer mehr Arbeiten, die diesen Zusammenhang untermauern (Ludlow et al., 2013). Ornish et al. zeigten hinsichtlich der Telomeraseaktivität in einer kleinen kontrollierten Studie, dass durch Änderung des Lebensstils die Telomeraseaktivität günstig beeinflusst werden kann, lieferte jedoch keinen Anhalt für die Mechanismen der Auswirkungen von Sport auf die Telomeraseaktivität (Ornish et al., 2008 und 2013).

Unklar ist bislang, ob nur regelmäßig durchgeführte, längerfristige körperliche Aktivität (oder der damit assoziierte Lebensstil) die Telomerfunktion günstig beeinflusst, oder ob es Akuteffekte gibt. In dieser Arbeit führte ein 5,6 km langer Waldlauf bei 10 jungen, gesunden Probanden zu einem bereits während des Laufes beginnenden glockenförmigen Anstieg der Telomeraseaktivität und zu einer Heraufregulation des Telomer-Repeat Binding Factor 2 in zirkulierenden Blutzellen über mindestens 24 Stunden. Bislang gibt es diesbzgl. nur eine weitere Studie, die in einem ähnlichen

Design (aber mit einem kürzeren Zeitverlauf) diese Frage untersucht hat: Chilton et al. zeigten, dass ein Lauf zu einer akuten Hochregulation von TERT-mRNA führte, welche für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert (Chilton et al., 2014). Hier wurde zwar die Telomeraseaktivität nicht gemessen, aber ein möglicher Zusammenhang zu Sirtuinen und microRNAs, also epigenetischen Regulationsmechanismen, gefunden.

Fiuza-Luces betitelten körperliche Aktivität als die einzige wirkliche „Polypille“, um vor kardiovaskulären Erkrankungen zu schützen (Fiuza-Luces et al., 2013), denn neben den neuerdings entdeckten Effekten auf die Zellalterung hat Lauftraining viele weitere positive akute Auswirkungen beim Menschen. So führt Laufen zu einer Zunahme der vaskulären Stickstoffmonoxid- (NO) Konzentration, was wiederum zu einer Vasodilatation und einer Abnahme des peripheren Widerstandes führt und letztendlich zu einer Abnahme des Blutdruckes. Die Zunahme der NO-Konzentration kommt durch eine Hochregulation der endothelialen NO-Synthase zustande, bedingt durch eine erhöhte flussbedingte Schubspannung bei körperlicher Aktivität (Schuler et al., 2013). Neben einer Zunahme der NO-Konzentration führt Lauftraining u.a. zu einer Ausschüttung von weißen Blutkörperchen. Sand et al. beschrieben, dass es durch leichte sowie schwere körperliche Aktivität wie Laufen, Skifahren oder Radfahren zu einer Leukozytose beim Menschen kommt (Sand et al., 2013). Mitte der 1990er Jahre wurde herausgefunden, dass sich als Subpopulation der Leukozyten im Blut aus dem Knochenmark stammende pluripotente vaskuläre Stammzellen, die so genannten endothelialen Progenitorzellen, isolieren lassen. Unsere Arbeitsgruppe fand heraus, dass Lauftraining einen akuten positiven Effekt auf die Zahl und Funktion dieser endothelialen Progenitorzellen (EPC) hat: Laufs et al. zeigten, dass diese Zellen durch ein intensives Lauftraining nach 10-30 Minuten in gesunden Probanden hochreguliert wurden (Laufs et al., 2005). Daneben führt Lauftraining zu einer akuten Hochregulation des Insulin-like Growth Factors 1 (IGF-1) (Berg & Bang, 2004), welcher im Alter eine erniedrigte Konzentration hat (Poehlman & Copeland, 1990). Die Rolle von IGF-1 bei der Vermittlung von Trainingseffekten auf die Myokard-Telomerase wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe erforscht (Werner et al., 2008). Demnach führte die Behandlung von Mäusen mit Growth Hormone (GH), dem „Upstream“ Regulator von IGF-1, zu einer über 10-fachen Aktivierung der Myokardtelomerase.

Auf Grund dieser Befunde wäre es spannend zu untersuchen, wie sich IGF-1 und EPC in unserem Waldlauf in Korrelation zur Telomerase verhalten und welche Rolle die eNOS/NO-Achse dabei spielt. Hierbei könnte z.B. IGF-1 eine bedeutende Rolle in der Hochregulation der Telomeraseaktivität spielen, da IGF-1 die Stammzellmobilisation aus dem Knochenmark reguliert. Hypothetisch könnte die im Blut messbare Steigerung der Telomeraseaktivität Ausdruck einer veränderten Blutzusammensetzung sein, d.h. das Spiegelbild einer vermehrten Ausschüttung von Progenitorzellen mit hoher Telomeraseaktivität sein. Training führt zur vermehrten Ausschüttung von Leukozyten aus dem Knochenmark (s.o.). Dies hat sich auch in dieser Arbeit bei den Waldläufern in einer Zunahme der MNC-Zahl gezeigt. Es ist fast bemerkenswert, dass sich, obwohl der Waldlaufversuch nur einen unkontrollierten Pilotversuch darstellte, so starke Effekte auf die Telomerproteine gefunden wurden. Leider hatten wir kein hämodynamisches und metabolisches Monitoring während des Laufens, d.h. keine Werte für Puls, Blutdruck und Laktat. Dennoch sahen wir den Effekt der akuten Hochregulation der Telomeraseaktivität und telomer-assoziierten Faktoren. Mit der vorliegenden Arbeit wird damit ein neues Forschungsfeld zur akuten Regulation der Telomeraseaktivität und telomer-assoziiierter Faktoren durch körperliche Aktivität betreten.

Daneben führte in unserer Arbeit ein dreimonatiges Intervalltraining mit 8 gesunden Personen mittleren Alters ohne relevanten Trainingshintergrund nach 3 Monaten zu einer Heraufregulation der Telomeraseaktivität und verminderten Expression von Seneszenzmarkern in zirkulierenden Blutzellen.

Warum ein Intervalltraining zur Erforschung dieser Effekte angewandt wurde, hatte mehrere Gründe. Intervalltraining wird gerade intensiv erforscht, weil es sportmedizinischen Studien zufolge stärkere Effekte auf die Fitness haben könnte. Es werden aktuell mehrere klinische Studien durchgeführt, um das Potential des Intervalltrainings als Sekundärprävention, z.B. bei Herzinsuffizienzpatienten, auszuloten. Daneben ist es sehr attraktiv, weil es, verglichen mit der Dauermethode, pro Sitzung kürzer dauert und man sich somit Zeit erspart. Dadurch besteht im Hinblick auf präventive Aspekte die Chance auf eine höhere Trainingscompliance. Nachteile des Intervalltrainings sind, dass hier vielleicht ein höheres Verletzungsrisiko – insbesondere bei Untrainierten am Anfang des Trainings – besteht. Dies haben wir im Kleinen auch bei unseren Trainingsteilnehmern beobachtet, von denen 10% während der Studie

wegen orthopädischer Probleme ausgeschieden sind. Grundsätzlich stellt sich die Frage, wie viel Sport zu viel ist, bzw. welche Form und Dosierung von körperlicher Aktivität die besten Effekte in der vaskulären Prävention erzielt. Man kann spekulieren, dass Intervalltraining stärkere Effekte hat, da es intensiver als die Dauermethode ist und somit mehr Scherstress verursacht, da dieses „Training am Limit“, verglichen mit moderatem aeroben Joggen, zu einer verstärkten Laktatausschüttung führt als Ausdruck eines stärkeren Ischämieereizes. Dadurch könnten die Auswirkungen von Intervalltraining auf die Telomeraseaktivität in zirkulierenden Zellen sowohl hämodynamisch als auch metabolisch erklärbar sein.

Diese Arbeit zeigt erstmals Auswirkungen von Intervalltraining auf die Telomerfunktion. Weitere Untersuchungen müssen herausfinden, wie diese Effekte zustandekommen. Hier wäre ein head-to-head-Vergleich verschiedener Sportarten in einem kontrollierten, randomisierten Design am sinnvollsten.

### **5.3 Limitationen der Arbeit**

Die zugrundeliegenden Mechanismen auf molekularer Ebene sind noch nicht vollständig verstanden und müssen weiter geklärt werden. Die Zahl der eingesetzten Tiere und der Menschen war klein. Diese Untersuchungen können daher nur als Pilotexperimente für weitere Untersuchungen in der Zukunft gelten.

Bei den Mäusen stellte sich das Problem, dass alte Mäuse schwer zu beschaffen sind, dadurch war die Anzahl der Mäuse gering. Optimal wäre es gewesen, Geschwistertiere aus einem Wurf prospektiv altern zu lassen, um gut vergleichbare Bedingungen zu haben. Als positiv ist hervorzuheben, dass sowohl die jungen als auch die alten Mäuse das gleiche Trainingsvolumen hatten (Laufdistanz / Tag).

Bei den Teilnehmern des Waldlaufes und der Intervallstudie untersuchten wir nur gesunde Probanden. Ob sich die Befunde in Patienten reproduzieren lassen, wäre eine wichtige Frage. Der gewählte Waldlauf war eine relativ willkürliche, unkontrollierte Trainingsintervention. Dadurch hatten wir keine Messdaten außer den molekularen Parametern, d.h. keine Hinweise, wie die Effekte auf Telomerase usw. zustande kamen.

Sie könnten hämodynamisch und oder metabolisch induziert sein. Wir wissen nicht wirklich, was in der Gefäßwand passiert, da wir nur zirkulierende Zellen untersucht haben. Eine weitere Limitation ist, dass der Zeitverlauf nach 24 Stunden endet. Es bleibt unklar, wie lange die Telomerase aktiviert bleibt. Zudem ist der Mechanismus, wie die Telomerase aktiviert wird, unklar. Hilfreich wären z.B. noch Messungen von anderen Parametern wie IGF1, Zytokinen wie IL6, Myokinen und reaktiven Sauerstoffspezies und endothelialen Progenitorzellen (EPC) gewesen, die alle bekanntermaßen akut durch körperliche Aktivität reguliert werden.

Obwohl das Training bei der Intervalltrainingsstudie sehr intensiv war, haben die Teilnehmer nicht stark hinsichtlich ihrer Fitness profitiert. Damit stellt sich die Frage, ob ein intensiveres und oder häufigeres Training mit Effekt auf die Fitness noch klarere Effekte auf die Regulatoren der Zellalterung ergeben hätte. Im Licht der Waldläufergebnisse war es nicht sinnvoll, die jeweils 2. Blutentnahme direkt nach dem Training zu machen, sondern ein Zeitverlauf wäre günstiger gewesen mit der Frage, ob die akute Telomeraseaktivierung nach dem dreimonatigen Training von der Amplitude vielleicht höher und von der Dauer länger ist. Zum anderen stellt sich die Frage, ob monozytäre Seneszenzproteine als Marker für die präventive Wirksamkeit eines Trainings geeignet sind, da direkte Messungen im Herz und in der Gefäßwand beim Menschen nicht möglich sind.

#### **5.4 Fazit und klinischer Ausblick**

Die vorliegende Promotionsarbeit hatte zum Ziel, den Einfluss von Lauftraining auf Regulatoren der zellulären Alterung zu charakterisieren. Die experimentellen Befunde in Mäusen lassen erstmals vermuten, dass in jungen Mäusen Lauftraining organspezifische Effekte auf die Telomerfunktion hat, da nur in kardiovaskulären Geweben und zirkulierenden Zellen eine Aktivitätssteigerung der Telomerase beobachtet wurde. Ferner fand sich erstmals, dass alte Mäuse parallel zur einer erhöhten Expression von Markern der Zellalterung auch eine möglicherweise kompensatorisch bedingte Steigerung der Telomeraseaktivität und telomer-assoziiierter Proteine hatten. Die Ergebnisse nach dem Lauftraining zeigten, dass auch hier systemische von organspezifischen Effekten auf die Zellalterung abgegrenzt werden müssen.

Sowohl in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe als auch in dieser Promotionsarbeit wurden die Auswirkungen von Lauftraining bei Menschen bzw. Laufradtraining bei Mäusen auf zelluläre Alterungsvorgänge untersucht. Es konnte erstmals eine akute Heraufregulation der Telomeraseaktivität und der TRF2-Expression nach einer einzigen Trainingseinheit dokumentiert werden. Die Schnelligkeit und die Zeitkinetik dieser Regulation legen nahe, dass diese Regulation ein physiologisch wichtiger Prozess sein könnte, aber seine Bedeutung bleibt vorerst unklar. Im Gegensatz zu den Vorarbeiten wurde erstmals eine prospektive Trainingsstudie mit Untersuchung der Regulatoren der Zellalterung durchgeführt, und diese hatte trotz verschiedener Limitationen ebenfalls einen Effekt auf die Telomerproteine.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde bilden unter Berücksichtigung der vorhergehenden Studien eine Basis, um in diesem Feld gezielt weitere Studien durchzuführen.

Wir stellen uns zum einen die Frage, welche Trainingsform, -intensität und -dauer besonders dazu geeignet ist, vaskuläre „Anti-Aging“-Effekte zu vermitteln. Hier ist insbesondere der Vergleich der Ausdauer- mit Intervalltraining und Krafttraining spannend. Dementsprechend wird eine große, randomisierte Studie in Kooperation mit dem Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes, Prof. Dr. med. Tim Meyer durchgeführt, in der prospektiv untrainierte Personen mittleren Alters für 6 Monate mit einer der 3 o.g. Sportmodalitäten trainiert werden. Zusätzlich gibt es eine Kontrollgruppe ohne Trainingsintervention und alle Probanden werden sportmedizinisch genau charakterisiert. Die Studie wird die Frage nach der Telomerregulation durch Sport sicherlich sehr viel weiter bringen. Durch die asservierten Seren wird es zudem vielleicht möglich sein, in Korrelation zur Telomerbiologie in Zellen neue zirkulierende Biomarker für die Anti-Aging-Effekte des Trainings zu finden, was sehr große Bedeutung hätte, da die Isolation der MNC zumindest für größere Studien zu aufwändig ist.

Im Hinblick auf die Organspezifität der Telomerregulation durch körperliches Training in Mäusen wird als direkte Konsequenz aus dieser Arbeit bereits ein neues Projekt durchgeführt, bei dem die organ- und zellspezifische Regulation der Telomerase, telomerassoziierter Proteine und der Zellalterung in verschiedenen Modellen einer kardiovaskulären Schädigung mit und ohne körperliches Training als protektive Intervention untersucht wird.



## Literaturverzeichnis

1. Baker AM, Fu Q, Hayward W, Victoria S, Pedroso IM, Lindsay SM, Fletcher TM (2011) The Telomere Binding Protein TRF2 Induces Chromatin Compaction. PLoS ONE 6:e19124.
2. Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE, Haber DA (1999) Heterozygous Germ Line hCHK2 Mutations in Li-Fraumeni Syndrome. Science 286:2528-31.
3. Berg U, Bang P (2004) Exercise and Circulating Insulin-Like Growth Factor I. Horm Res. 62:50-8.
4. Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. Nature Reviews Genetics 6:611-22.
5. Boccardi V, Paolisso G (2014) Telomerase activation: A potential key modulator for human healthspan and longevity. Ageing Res. Rev. 15:1-5.
6. Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, Thompson JR, Ford I, Shepherd J, Packard CJ, Samani NJ (2007) Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. Lancet 369:107-114.
7. Butler MG, Tilburt J, DeVries A, Muralidhar B, Aue G, Hdges L, Atkinson J, Schwartz H (1998) Comparison of Chromosome Telomere Integrity in Multiple Tissues from Subjects at Different Ages. Cancer Genet Cytogenet 105:138-144.
8. Calado RT, Young NS (2009) Telomere diseases. N Engl J Med 361:2353-65.
9. Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN (2003) Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. Nucleic Acids Res. 31:1576-1583.
10. Chilton WL, Marques FZ, West J, Kannourakis G, Berzins SP, O'Brien BJ, Charchar FJ (2014) Acute Exercise Leads to Regulation of Telomerase Associates Genes and MicroRNA Expression in Immune Cells. PLoS ONE 9:e92088.
11. De Lange T (2009) How telomeres solve the end-protection problem. Science 326:948-52.



12. Donate LE, Blasco MA (2011) Telomeres in cancer and ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366:76-84.
13. Ekelund U, Palla L, Brage S, Franks PW, Peters T, Balkau B, Diaz MJ, Huerta JM, Agnoli C, Arriola L, Ardanaz E, Boeing H, Clavel-Chapelon F, Crowe F, Fagherazzi G, Groop L, Hainaut P, Føns Johnsen N, Kaaks R, Khaw KT, Key TJ, de Lauzon-Guillain B, May A, Monninkhof E, Navarro C, Nilsson P, Nautrup Østergaard J, Norat T, Overvad K, Palli D, Panico S, Redondo ML, Ricceri F, Rolandsson O, Romaguera D, Romieu I, Sánchez Pérez MJ, Slimani N, Spijkerman A, Teucher B, Tjønneland A, Travier N, Tumino R, Vos W, Vigl M, Sharp S, Langenberg C, Forouhi N, Riboli E, Feskens E, Wareham NJ (2012) Physical activity reduces the risk of incident type 2 diabetes in general and in abdominally lean and obese men and women: the EPIC-InterAct Study. *Diabetologia* 55:1944-1952.
14. Fiuza-Luces C, Garatachea N, Berger NA, Lucia A (2013) Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda)* 28:330-58.
15. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW (2002) Telomerase and differentiation in multicellular organisms: Turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69:188-197.
16. Fuster JJ, Andrés V (2006) Telomere Biology and Cardiovascular Disease. *Circ Res* 99:1167-1180.
17. Fyhrquist F, Saijonmaa O, Strandberg T (2013) The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nature reviews Cardiology* 10:274-83.
18. Gielen S, Schuler G, Adams V (2010) Cardiovascular Effects of Exercise Training: Molecular Mechanisms. *Circulation* 122:1221-1238.
19. Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, Brondello JM, Dulic V (2004) DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J* 23:2554-2563.
20. Hoff J, Helgerud J (2004) Endurance and strength training for soccer players: physiological considerations. *Sports Med.* 34:165-80.
21. Hur JH, Walker DW (2009) P53, sex, and aging: lessons from the fruit fly. *Aging (Albany NY)* 1:881-883.
22. Irving BA, Davis CK, Brock DW, Weltman JY, Swift D, Barrett EJ, Gaesser GA, Weltman A (2008) Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. *Med Sci Sports Exerc* 40:1863-1872.

23. Kipling D, Cooke HJ (1990) Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347:400-402.
24. Krutmann J. Umweltinduzierte Alterungsprozesse. Jahresbericht 2008. Deutsche Forschungsgemeinschaft.
25. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Böhm M, Kindermann W, Nickenig G (2005) Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 12:407-14.
26. Liggett WH Jr, Sidransky D (1998) Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 16:1197-206.
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
28. Ludlow AT, Zimmerman JB, Witkowski S, Hearn JW, Hatfield BD, Roth SM (2008) Relationship between Physical Activity Level, Telomere Length, and Telomerase Activity. *Med Sci Sports Exerc* 40:1764-1771.
29. Ludlow AT, Witkowski S, Marshall MR, Wang J, Lima LCJ, Guth LM, Spangenburg EE, Roth SM (2012) Chronic Exercise Modifies Age-Related Telomere Dynamics in a Tissue-Specific Fashion. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67:911-926.
30. Ludlow AT, Ludlow LW, Roth SM (2013) Do telomeres adapt to physiological stress? Exploring the effect of exercise on telomere length and telomere-related proteins. *BioMed research international* 2013:601368.
31. Martin GM, Sprague CA (1972) Clonal senescence and atherosclerosis. *Lancet* 2:1370-1371.
32. Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, Goddard M, Bennett M (2006) Vascular Smooth Muscle Cells Undergo Telomere-Based Senescence in Human Atherosclerosis: Effects of Telomerase and Oxidative Stress. *Circ Res* 99:156-164.
33. McCarty MF (2004) Optimizing endothelial nitric oxide activity may slow endothelial aging. *Med Hypotheses* 63:719-23.
34. Muraski JA, Rota M, Misao Y, Fransioli J, Cottage C, Gude N, Esposito G, Delucchi F, Arcarese M, Alvarez R, Siddiqi S, Emmanuel GN, Wu W, Fischer K, Martindale JJ, Glembotski CC, Leri A, Kajstura J, Magnuson N, Berns A, Beretta

- RM, Houser SR, Schaefer EM, Anversa P, Sussman MA (2007) Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nature Medicine* 13:1467-1475.
35. Oh H, Wang SC, Prahash A, Sano M, Moravec CS, Taffet GE, Michael LH, Youker KA, Entman ML, Schneider MD (2003) Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5378-5383.
  36. Oren M, Rotter V (2010) Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001107.
  37. Ornish D, Lin J, Daubenmier J, Weidner G, Epel E, Kemp C, Magbanua MJM, Marlin R, Yglecias L, Carroll PR, Blackburn EH (2008) Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol* 9:1048-1057.
  38. Ornish D, Lin J, Chan JM, Epel E, Kemp C, Weidner G, Marlin R, Frenda SJ, Magbanua MJM, Daubenmier J, Estay I, Hills NK, Chainani-Wu M, Carroll PR, Blackburn EH (2013) Effect of comprehensive lifestyle changes on telomerase activity and telomere length in men with biopsy-proven low-risk prostate cancer: 5-year follow-up of a descriptive pilot study. *Lancet Oncol* 14:1112-20.
  39. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syväanne M, Scholte Op Reimer WJM, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F (2012) European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J*. 33:1635-701.
  40. Poehlman ET, Copeland KC (1990) Influence of physical activity on insulin-like growth factor-I in healthy younger and older men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 71:1468-1473.
  41. Rammos C, Hendgen-Cotta UB, Deenen R, Pohl J, Stock P, Hinzmann C, Kelm M, Rassaf T (2014) Age-related vascular gene expression profiling in mice. *Mechanisms of Ageing and Development* 135:15-23.
  42. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D (2007) Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res*. 35:7475-7484.

43. Samani NJ, Boulby R, Butler R, Thompson JR, Goodall AH (2001) Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 358:472-473.
44. Sand KL, Flatebo T, Andersen MB, Maghazachi AA (2013) Effects of exercise on leukocytosis and blood hemostasis in 800 healthy young females and males. *World J Exp Med.* 3:11-20.
45. Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, Stern Y (2009) Physical Activity, Diet, and Risk of Alzheimer Disease. *JAMA* 302:627-637.
46. Schuler G, Adams V, Goto Y (2013) Role of exercise in the prevention of cardiovascular disease: results, mechanisms, and new perspectives. *Eur Heart J.* 34:1790-9.
47. Serrano AL, Andrés V (2004) Telomeres and Cardiovascular Disease: Does Size Matter? *Circ Res.* 94:575-584.
48. Sussman MA, Völkers M, Fischer K, Bailey B, Cottage CT, Din S, Gude N, Avitabile D, Alvarez R, Sundararaman B, Quijada P, Mason M, Konstandin MH, Malhowski A, Cheng Z, Khan M, McGregor M (2011) Myocardial AKT: The omnipresent nexus. *Physiol Rev.* 91:1023-70.
49. Statistisches Bundesamt Deutschland, 2010; Im Blickpunkt: Ältere Menschen in Deutschland und der EU, 2011.
50. Trinity JD, Groot HJ, Layec G, Rossman MJ, Ives SJ, Richardson RS (2014) Impact of age and body position on the contribution of nitric oxide to femoral artery shear rate: implications for atherosclerosis. *Hypertension* 63:1019-25.
51. Van der Harst P, van der Steege G, de Boer RA, Voors AA, Hall AS, Mulder MJ, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ (2007) Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 49:1459-1464.
52. Van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92:401-13.
53. Vasan RS, Demissie S, Kimura M, Cupples LA, White C, Gardner JP, Cao X, Levy D, Benjamin EJ, Aviv A (2009) Association of leukocyte telomere length with echocardiographic left ventricular mass: The framingham heart study. *Circulation* 120:1195-1202.
54. Werner C, Hanhoun M, Widmann T, Kazakov A, Semenov A, Pöss J, Bauersachs J, Thum T, Pfreudenschuh M, Müller P, Haendeler J, Böhm M, Laufs

- U (2008) Effects of Physical Exercise on Myocardial Telomere-Regulating Proteins, Survival Pathways, and Apoptosis. *J Am Coll Cardiol*. 52:470-82.
55. Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, Hanhoun M, Scharhag J, Büchner N, Meyer T, Kindermann W, Haendeler J, Böhm M, Laufs U (2009) Physical Exercise Prevents Cellular Senescence in Circulating Leukocytes and in the Vessel Wall. *Circulation*. 120:2438-47.
56. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB (1998) Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation* 97:1837-47.
57. Wilson WR, Herbert KE, Mistry Y, Stevens SE, Patel HR, Hastings RA, Thompson MM, Williams B (2008) Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J* 29:2689-2694.
58. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L (2004) Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364:937-52.

## 6 Danksagung und Publikationen

Erstens danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Ulrich Laufs für die Bereitstellung des Themas der Dissertation, der Räumlichkeiten der Klinik Innere III des Universitätsklinikums des Saarlandes und für die stets offene Tür.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm für die Möglichkeit, die Dissertation in seiner Abteilung erstellen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. med. Christian Werner, der mich während meiner Arbeit motiviert und unterstützt hat und mir jederzeit mit großem Fachwissen und Engagement zur Seite stand.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. med. Tim Meyer und allen Mitarbeitern des Institutes für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes für die Zusammenarbeit bei der Intervalltrainingsstudie.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen technischen Assistentinnen, Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern für die kollegiale Zusammenarbeit bedanken, die meine Zeit im Labor sowohl menschlich als auch wissenschaftlich sehr angenehm gestaltet haben.

### **Folgende Abstracts sind mit Hilfe dieser Dissertation entstanden:**

Werner C, **Hauser M**, Böhm M, Laufs U (2011) Körperliche Belastung führt zu einer akuten Aktivierung der Telomerase in mononukleären Zellen. Clin Res Cardiol 100, Suppl 1, P457.

Werner C, **Hauser M**, Böhm M, Laufs U. Physical activity mediates acute enhancement of telomerase activity in mononuclear cells of untrained healthy subjects. European Heart Journal 32 (Suppl), 2344.

Werner C, **Hauser M**, Schirra K, Meyer T, Böhm M, Laufs U (2012) Ein dreimonatiges Intervall-Ausdauertraining bei untrainierten Probanden erhöht die Telomeraseaktivität

und senkt die p53-Expression in mononukleären Zellen. Clin Res Cardiol 101, Suppl 1:V811.

Werner C, **Hauser M**, Schirra K, Meyer T, Böhm M, Laufs U (2012) High-intensity interval training activates telomerase and reduces p53 expression. European Heart Journal 33 (Suppl), 5229.

Werner C, **Hauser M**, Meyer T, Böhm M, Laufs U (2012) High-intensity Interval Training Reduces P53 Expression and Increases Telomerase Activity in Circulating Mononuclear Cells of Untrained Subjects. Circulation 2012;125:18220.